

Functional Analysis of ZFAT through Specific siRNA against ZFAT in Ba/F3 Cell Line

Midori KOYANAGI, Keiko DOI, Takahiro FUJIMOTO,
Toshiyuki TSUNODA, Yasuo TAKASHIMA and Senji SHIRASAWA

Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Abstract : The ZFAT (zinc-finger gene in autoimmune thyroid disease susceptibility region) gene encodes a transcription-related protein containing one AT hook and 18 C2H2 zinc finger domains. ZFAT is highly conserved among ZFAT orthologues from fish to mammalian species and is mainly expressed in B and T lymphocytes. We previously reported that ZFAT is involved in the regulation of the expressions of immune-related genes through the analysis of overexpression of ZFAT in mouse Ba/F3 cell line. In this study, we have analyzed the function of ZFAT through the down-regulation of ZFAT using specific siRNA (short interfering RNA) against ZFAT in Ba/F3 cells, showing that ZFAT regulates the expressions of genes involved in growth, differentiation and cell-cell adhesion. These results suggested that ZFAT plays critical roles not only in immune-related genes but also in the regulation of growth- and differentiation-related genes.

Key words : ZFAT, siRNA, Expression Array Analysis, Gene Ontology

Ba/F3 細胞における免疫関連遺伝子 ZFAT の siRNA-発現抑制系による機能解析

小柳 緑 土井 佳子 藤本 崇宏
角田 俊之 高島 康郎 白澤 専二

福岡大学医学部細胞生物学

要旨 : 自己免疫性甲状腺疾患 (Autoimmune Thyroid Disease : AITD) 関連候補遺伝子として我々が同定した ZFAT (zinc-finger gene in AITD susceptibility region) 遺伝子は、1 個の AT-hookモチーフと18個の C2H2 型 zinc-finger モチーフを含み、転写関連因子様タンパク質をコードする。ZFAT 遺伝子は魚類から哺乳類に至るまで非常に強く保存された遺伝子であり、免疫担当細胞である B 細胞と T 細胞に主に発現する。これまでに、マウス免疫系細胞株 Ba/F3 において ZFAT を過剰発現させる系を解析することにより、ZFAT が免疫関連遺伝子群の発現制御において重要な役割を担うことを報告してきた。今回、Ba/F3 において siRNA (short interfering RNA) による ZFAT 発現抑制系を構築し、発現アレイ解析による ZFAT の機能解析を行った。その結果、ZFAT の発現抑制により、細胞の分化・増殖に関連する遺伝子群が変動することが明らかとなった。これらのことより、ZFAT が免疫関連遺伝子の発現制御のみならず、細胞の分化・増殖という面においても重要な役割を果たす可能性が示唆された。

別刷請求先 : 〒814-0180 福岡市城南区七隈7-45-1 福岡大学医学部細胞生物学 小柳 緑

TEL 092-801-1011 内線3255 FAX 092-865-6032 koyanagi@fukuoka-u.ac.jp

学会発表や研究費の出所

本研究は、平成18年度~20年度 文部科学省補助金「ゲノムネットワークプロジェクト・免疫疾患に関する転写因子群ネットワークの解明」(代表者、白澤専二)、および、平成17年度~20年度、日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究B)「自己免疫疾患関連遺伝子 ZFAT 及び ZFAT に制御される免疫疾患関連遺伝子群の解明」(代表者、白澤専二)の補助を受けた。

キーワード：ZFAT，siRNA，発現アレイ解析，Gene Ontology

はじめに

最も一般的な自己免疫性疾患である自己免疫性甲状腺疾患 (Autoimmune Thyroid Disease: AITD) には、甲状腺刺激ホルモンレセプター抗体を産生することにより甲状腺機能が亢進するグレーブス病と、T細胞が関与する組織・細胞障害によって甲状腺機能が低下する橋本病が含まれる^{1,2)}。これら2つの疾患は臨床的にはまったく異なる表現形を示すが、甲状腺内におけるT細胞の浸潤、サイログロブリンやTPOに対する自己抗体の産生などの共通点が見られることや、同一家系内に両疾患が発症する例があることから、遺伝要因が存在することが示唆されている。

そこでわれわれは、AITD罹患同胞対を対象とした連鎖解析、マイクロサテライトマーカーおよびSNPを用いた患者-対照群による相関解析を行ない^{3,4)}、その結果、遺伝子ZFATをAITD関連候補遺伝子として同定した³⁾。

ZFATは18個のC2H2型zinc-fingerモチーフと1個のAT-hookモチーフ、さらに核局在シグナルを持つ転写制御因子と推定される。zinc-fingerモチーフを含むタンパクは、ほ乳類ゲノムにおいて最大のプロテイン・スーパーファミリーのひとつを構成し、その多くが細胞活性における転写調節因子として特徴づけられ⁵⁾、これらの機能を解析することは、細胞生物学的に重要な知見を提供するのみならず、ヒト疾患の病因・病態の解明につながると考えられる。また、ZFATの塩基配列は魚類からほ乳類まで高度に進化的に保存されていること⁶⁾からZFATは進化上重要な遺伝子であると考えられる。

これまでに、ZFATは主に免疫担当細胞であるB細胞とT細胞に発現すること、および、ZFATの過剰発現系を利用してZFATが免疫関連遺伝子の発現制御に関与することを報告してきた⁶⁾。今回、われわれは、siRNAを用いてZFATの発現を抑制する系を樹立し、発現アレイ解析を行ない、ZFATの機能を解明することを目的として研究を行なった。

材料と方法

1. 細胞培養とsiRNA

マウス免疫系細胞株Ba/F3は37℃、5%CO₂の環境下で10%FCS (fetal calf serum) 及び10%WEHI3B培養上清を含むRPMI640内で培養された。このBa/F3

細胞株に電気穿孔法を用いて、siRNA (small interfering RNA) およびコントロールRNAを導入した。マウスZFATをターゲットとした標的配列の異なる2種のsiRNAがデザインされ (GenBank acc #NM_198664, nt. 231-255, 740-764)、ZFATをターゲットとするsiRNAと同じ数のそれぞれのヌクレオチドを含むスクランブルRNAがコントロールとして使用された。以下のsiRNAデュプリケートが使用された：

Zfat #1, 5'-AAACGUGGGUCACGAGUUCUGACUG-3' と 5'-CAGUCAGAACUCGUGACCCACVGUUU-3'; scramble RNA #1, 5'-AAAGACGUGGGUCACGAGUUCUCUG-3' と 5'-CAGAGAACUCGUGACCCACGUCUUU-3'; Zfat #2, 5'-UUCAUGAGCAGUUAAGACCACGCUG-3' と 5'-CAGCGUGGUCUUAAACUGCUCAUGAA-3'; scramble RNA #2, 5'-UUCGCAGAGUUGACGAAUACCACUG-3' と 5'-CAGUGGUAAUUCGUAACUCUGCGAA-3'。

2. 抗マウスZFAT抗体の作製とウエスタン・ブロット解析

ラビット・抗マウスZFATポリクローナル抗体を先に述べた方法で作製した⁶⁾。マウス免疫系細胞株Ba/F3をRIPAバッファー (50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail (Roche)) で溶解させ、以前示した方法⁷⁾でウエスタン・ブロット解析を行なった。使用した抗体は、抗ZFAT抗体 (希釈1:1000)、抗actin抗体 (H-300; Santa Cruz Biotechnology; 希釈1:1000)。

3. 発現アレイ解析とGene Ontology解析

siRNAを導入したBaF3細胞株2種と、それぞれに対するコントロール細胞株2種からトリゾールを使用してtotal RNAを抽出・精製した。ビオチン化cRNAの合成、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 array (Affymetrix) へのハイブリダイゼーション、ストレプト・アビジンの結合、蛍光シグナルのスク্যান、データ処理はメーカー説明書、および前に述べられた方法⁸⁾に従って行なった。得られたデータファイルはGeneSpring v7.3 (Agilent Technologies) にロードされ、“per-chip normalization”は50%に、“per-gene normalization”は2つのコントロールクローンの発現レベルの平均値に対して標準化された。発現変動遺伝子群の抽出には2つの独立したフィルタリング法が使用された。1つ目の方法はVolcano Plotフィルタリング法でこれはデュプリ

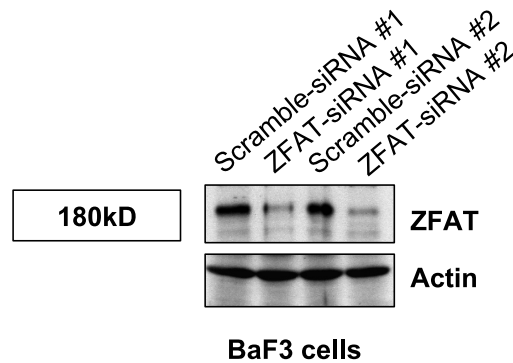


図1 Ba/F3 細胞における siRNA 処理を確認するためのウエスタン・プロット解析 .
2 種類の siRNA 処理サンプルでは各々に対するコントロール RNA 処理サンプルより有意にバンドの強さが減少していた .

表1 発現アレイ解析で同定された siRNA 処理による発現変動遺伝子数

Platform	Expression	Volcano Plot/No. of genes (%)	
		Fold change > 1.5 (p < 0.1)	Fold change > 2.0 (p < 0.1)
Affymetrix GeneChip	Up	91 (0.42%)	22 (0.10%)
Mouse Genome 430 2.0	Down	101 (0.47%)	17 (0.08%)
(21,561 genes)	Total	192 (0.89%)	39 (0.18%)

Platform	Expression	Venn Diagram/No. of genes (%)	
		Fold change > 1.5	Fold change > 2.0
Affymetrix GeneChip	Up	163 (0.76%)	27 (0.13%)
Mouse Genome 430 2.0	Down	162 (0.75%)	24 (0.11%)
(21,561 genes)	Total	325 (1.51%)	51 (0.24%)

表2 発現アレイ解析で同定された siRNA 処理による発現変動遺伝子名

Up-regulated genes

Common name	Description
Ache	Acetylcholinesterase
Btg1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative
Cd52	CD52 antigen
Chst10	Carbohydrate sulfotransferase 10
Fgl2	Fibrinogen-like protein 2
Foxp2	Forkhead box P2
Mgst1	Microsomal glutathione S-transferase 1
P2rx4	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel4
Rras	Harvey rat sarcoma oncogene, subgroup R
Tac4	Tachykinin 4

Down-regulated genes

Common name	Description
Atrx	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked homolog (human)
Bcl2l1	Bcl2-like 1
Cd84	CD84 antigen
Eif4g1	Eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1
Hace1	HECT domain and ankyrin repeat containing, E3 ubiquitin protein ligase 1
Hras1	Harvey rat sarcoma virus oncogene 1
Jun	Jun oncogene
Kifap3	Kinesin-associated protein 3
Rbx1	Ring-box 1
Tmem33	Transmembrane protein 33

ケートの平均値間の相対的な倍率変動と統計的有意水準を考慮したものである。もう1つの方法は指定した限界閾値について、2つの siRNA 処理サンプルがそれぞれ対応する2つのコントロールサンプルに対して常に超えている遺伝子群を選択する Venn Diagram 法である。さらに、これら抽出された遺伝子群の機能を検索するために、GeneSpring ソフトを用いた Gene Ontology (GO) 解析を行なった。

結 果

1. siRNA 処理による ZFAT の発現抑制

Ba/F3 細胞における siRNA 処理が機能しているかを確認するために、ラビット・抗マウス ZFAT・ポリクローナル抗体を用いてウエスタン・プロット解析を行なった(図1)。検出されたバンドの強さは、ZFAT をターゲットとした2種類の siRNA で処理した Ba/F3 細胞上で、それぞれのコントロール RNA で処理したものに比べ有意に減少した。これらのことより、siRNA

処理によって Ba/F3 細胞内で ZFAT の発現が抑制されていることが確認された。

2. 発現アレイ解析と GO 解析

ZFAT の機能を理解するために、マウス免疫細胞株 Ba/F3 において、包括的な遺伝子発現に対する ZFAT 発現抑制の影響を調べた。ZFAT をターゲットとした siRNA 処理をした2つのクローンと、それらに対するコントロールクローンについて、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を用いてマイクロアレイベースの発現解析を行なった。ZFAT・siRNA 処理での発現変動遺伝子を抽出するために、2つのフィルタリング法 (Volcano Plot, Venn Diagram) と、2つの限界閾値 (1.5, 2.0) を用いた。信頼できる発現量を示す 21,561 個の “present/marginal” 遺伝子の中から、それぞれの解析において抽出された発現変動遺伝子数を表1に示した。また、発現変動遺伝子の一部を表2に示した。

次に、これら ZFAT 制御遺伝子間に共通する機能的

表3 発現アレイ解析で同定された siRNA 処理による発現変動遺伝子の GO 解析

Up-regulated genes (62 genes)

Category	Genes in Category		Genes in List in Category		
	n	%	n	%	p-Value
GO:45603:positive regulation of endothelial cell differentiation	1	0.005	1	1.613	2.79E-03
GO:6581:acetylcholine catabolism	1	0.005	1	1.613	2.79E-03
GO:46878:positive regulation of saliva secretion	1	0.005	1	1.613	2.79E-03
GO:46877:regulation of saliva secretion	1	0.005	1	1.613	2.79E-03
GO:30308:negative regulation of cell growth	35	0.158	2	3.226	4.30E-03
GO:45792:negative regulation of cell size	35	0.158	2	3.226	4.30E-03
GO:42439:ethanolamine and derivative metabolism	2	0.009	1	1.613	5.57E-03
GO:8291:acetylcholine metabolism	2	0.009	1	1.613	5.57E-03
GO:45212:neurotransmitter receptor biosynthesis	3	0.014	1	1.613	8.35E-03
GO:1919:regulation of receptor recycling	3	0.014	1	1.613	8.35E-03
GO:31623:receptor internalization	3	0.014	1	1.613	8.35E-03
GO:45601:regulation of endothelial cell differentiation	4	0.018	1	1.613	1.11E-02

Down-regulated genes (62 genes)

Category	Genes in Category		Genes in List in Category		
	n	%	n	%	p-Value
GO:43086:negative regulation of enzyme activity	107	0.482	3	4.839	3.34E-03
GO:48167:regulation of synaptic plasticity	37	0.167	2	3.226	4.79E-03
GO:35026:leading edge cell differentiation	2	0.009	1	1.613	5.57E-03
GO:46586:regulation of calcium-dependent cell-cell adhesion	2	0.009	1	1.613	5.57E-03
GO:46587:positive regulation of calcium-dependent cell-cell adhesion	2	0.009	1	1.613	5.57E-03
GO:51005:negative regulation of lipoprotein lipase activity	2	0.009	1	1.613	5.57E-03
GO:16337:cell-cell adhesion	414	1.863	5	8.065	5.94E-03
GO:50790:regulation of enzyme activity	448	2.016	5	8.065	8.22E-03
GO:51004:regulation of lipoprotein lipase activity	4	0.018	1	1.613	1.11E-02
GO:6897:endocytosis	325	1.463	4	6.452	1.29E-02

Of 163 up-regulated and 162 down-regulated genes, 62 and 62, respectively, were found to have GO term annotations and were subjected to the GO term enrichment analysis.

特徴を検索するために、解析ソフト GeneSpring を使用して GO 解析を試みた。表 3 に Venn Diagram フィルタリング法 (限界閾値 1.5) によって抽出された遺伝子群の GO 分析結果を示した。統計的に有意な ($p < 10^{-3}$) ことを示した GO カテゴリーとして、“細胞分化”、“細胞増殖”、“細胞接着”のキーワードに象徴される機能が抽出された。データは示していないが Volcano Plot フィルタリング法で選択された遺伝子群の GO 分析でも同様の結果が得られた。

考 察

今回の研究結果より、ZFAT は細胞分化、細胞増殖、細胞接着に関連する遺伝子群の発現の制御に重要な役割を果たすことが示された。さらに、これまでに行なった ZFAT 強制発現系における網羅的遺伝子発現解析結果⁶⁾と今回の結果を比較検討した結果、ZFAT の過剰発現系と発現抑制系との間で逆相関する遺伝子群としては、“プログラム細胞死”、“シグナリング”、“細胞周期”のカテゴリーが抽出された。これらの結果は、ZFAT が免疫、増殖、分化のみならず、プログラム細胞死や細胞周期関連遺伝子の発現制御に関与することを示唆し、非常に興味深く、ZFAT の機能解明は根本的な生命現象の理解、先駆的な治療法の開発に繋がる可能性があると考えられる。

現在進行させている ZFAT 遺伝子改変マウスを対象とした個体レベルでの機能解析や ChIP-chip 法を利用した ZFAT 直接標的遺伝子の同定を進めることにより、転写制御因子をコードすると考えられる ZFAT が関与するネットワークの全容が明らかにされることが期待される。

謝 辞

本研究は、文部科学省「ゲノムネットワークプロジェクト・免疫疾患に関与する転写因子群ネットワークの解明」、日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 B) 「自己免疫疾患関連遺伝子 ZFAT 及び ZFAT に制御される免疫疾患関連遺伝子群の解明」の研究費により行われた。

文 献

- 1) Fisfalen ME, DeGroot LJ: Grave's disease and autoimmune thyroiditis. In: Weintraub BD (ed), *Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations*, pp. 319–370, Raven Press (New York), 1995.
- 2) Stassi G, Maria RD: Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2: 195–204, 2002.
- 3) Shirasawa S, Harada H, Furugaki K, Akamizu T, Ishikawa N, Ito K, Ito K, Tamai H, Kuma K, Kubota S, Hiratani H, Tsuchiya T, Baba I, Ishikawa M, Tanaka M, Sakai K, Aoki M, Yamamoto K, Sasazuki T: SNPs in the promoter of a B cell-specific antisense transcript, SAS-ZFAT, determine susceptibility to autoimmune thyroid disease. *Hum Mol Genet* 13: 2221–2231, 2004.
- 4) Sakai K, Shirasawa S, Ishikawa N, Ito K, Tamai H, Kuma K, Akamizu T, Tanimura M, Furugaki K, Yamamoto K, Sasazuki T: Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31–q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23–q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese. *Hum Mol Genet* 10: 1379–1386, 2001.
- 5) Ravasi T, Huber T, Zavolan M, Forrest A, Gaasterland T, Grimmond S, RIKEN GER Group, GSL Members, Hume DA: Systematic characterization of the zinc-finger-containing proteins in the mouse transcriptome. *Genome Res* 13: 1430–1442, 2003.
- 6) Koyanagi M, Nakabayashi K, Fujimoto T, Gu N, Baba I, Takashima Y, Doi K, Harada H, Kato N, Sasazuki T, Shirasawa S: ZFAT expression in B and T lymphocytes and identification of ZFAT-regulated genes. *Genomics* 91: 451–457, 2008.
- 7) Okumura K, Shirasawa S, Nishioka M, Sasazuki T: Activated Ki-Ras suppresses 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced activation of the c-Jun NH₂-terminal kinase pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res* 59: 2445–2450, 1999.
- 8) Fujimoto T, Koyanagi M, Baba I, Nakabayashi K, Kato N, Sasazuki T, Shirasawa S: Analysis of KRAP expression and localization, and genes regulated by KRAP in a human colon cancer cell line. *J Hum Genet* 52: 978–984, 2007.

(平成20.7.10受付, 20.9.5受理)