

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770187
 研究課題名 (和文) 大腸菌人工染色体を用いた赤血球分化鍵因子 GATA-1 遺伝子の制御機構の解明
 研究課題名 (英文) Analysis of Gata1 gene transcriptional regulation

研究代表者
 森口 尚 (MORIGUCHI TAKASHI)
 東北大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：10447253

研究成果の概要：

2年間の研究により以下のことを明らかにした。

1. マウス *Gata1* 遺伝子を含む 196 kb の大腸菌人工染色体 (BAC) に GFP を挿入した構築を用いて作成したトランスジェニックマウス (GATA1-BAC-GFPマウス) では、GFP レポーター遺伝子の発現パターンが内在性 GATA1 の発現パターンを忠実に再現することが明らかになった。
2. GATA1-BAC-GFPマウスでの GFP 蛍光と血液細胞表面マーカーの組み合わせにより、赤血球系前駆細胞を分化段階ごとに分離する方法を確立した。
3. GATA-1 ノックダウンマウス白血病細胞に由来する細胞株を用いて、Chip on ChIP 解析により多くの GATA-1 標的遺伝子を見いだした。
4. GATA1-BAC-GFPマウスを用いた解析から、GATA-1 遺伝子の制御領域である G1HE および double GATA 領域の機能を明らかにした。
5. ヒト GATA-1BAC トランスジェニックマウスを作成し、GATA-1 変異マウスの胎児致死性をレスキューすることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：GATA1、トランスジェニックマウス、BAC、赤血球、白血病

1. 研究開始当初の背景

GATA1は、GATA配列を認識してDNAに結合する転写調節因子GATAファミリーのひとつであり、赤血球分化に重要な遺伝子発現を統合的に制御していることが知られている。また、GATA-1のタンパク質の変異および、発現量の低下は、それぞれ急性巨核芽球性白血病および特発性骨髄繊維症の原因となることが知られている。我々はGATA1の発現量が減弱した変異マウスにおいても、白血病が再現されることをこれまでに明らかにした。GATA1は造血前駆細胞から赤血球への分化過程において、ダイナミックな発現レベルの変化を示し、この生理的な発現レベルの変化は正常な造血細胞分化に必須の現象である。従って、赤血球前駆細胞でのGATA1タンパク質の機能を解明し、*Gata1*遺伝子の発現制御機構を明らかにすることが、赤血球造血システムを理解し、*Gata1*遺伝子変異によるヒト血液疾患の発症機序を理解するための重要課題である。

2. 研究の目的

本申請研究では、以下の各項目を目的とした。

- (1) 正常な赤血球造血に必要な、転写因子 *Gata1* 遺伝子の赤血球前駆細胞での発現制御機構を明らかにする。
- (2) 赤血球前駆細胞での GATA1 の機能を解明するために、分化進行に必要な GATA1 の標的遺伝子を同定する。
- (3) ヒト白血病症例にみられた変異型 GATA1 分子の機能欠失を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) *Gata1* 遺伝子の赤血球前駆細胞での発現制御機構を解明するために、マウス *Gata1* 遺伝子を含む 196 kb の大腸菌人工染色体 (BAC) に GFP を挿入した構築を用いて、トランスジェニックマウス (GATA1-BAC-GFP マウス) を作製し、本マウスを用いて GFP レポーター遺伝子の発現解析を行った (図1)。

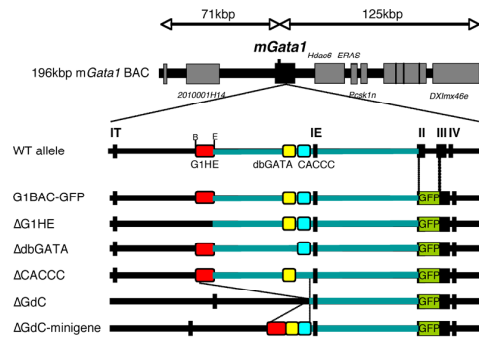


図1. 大腸菌内での相同組み換えを利用したGATA1-BACへのGFP挿入及び各種制御領域欠失によるトランスジーン構築

- (2) 更に、*Gata1* 遺伝子の制御領域 (G1HE 領域、dbGATA 領域) の生理的な機能を明らかにするために、それぞれの制御領域に変異を導入した GATA1-BAC-GFP トランスジェニックマウスを作成した。そして、GFP レポーター遺伝子の発現パターンの変化を解析することにより、各制御領域の欠失による、赤血球分化段階ごとの GFP 蛍光発現の変化を詳細に解析した (図1)。

- (3) 染色体の *Gata1* 遺伝子座上で制御領域

(G1HE 領域、dbGATA 領域) に変異を加えたマウス (dbGATA 欠損マウス、G1HE 欠損マウス) を用い、造血前駆細胞から赤血球の各分化段階の細胞画分における、内在性 *Gata1* 遺伝子の発現レベルの変化を解析した (図2)。

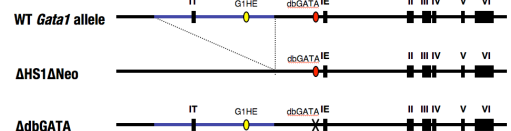


図2. 染色体上の *Gata1* 遺伝子座での制御領域欠損マウス

- (4) 赤血球前駆細胞での GATA-1 の機能を解明するために、新規に樹立した培養細胞株を用いて、GATA1 の標的遺伝子を ChIP on Chip 法により網羅的に探索した (図3)。

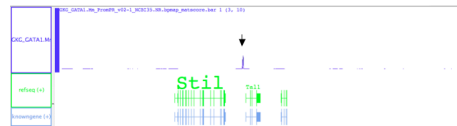


図3. ChIP on chipによるGATA-1標的遺伝子の同定(一部)。Tal1 遺伝子プロモーターでのGATA-1の特異的な結合(矢頭)を示す。

- (5) GATA1 欠失細胞株に対して、変異型ヒト GATA1 分子を導入して、その機能的欠失を明らかにする (図4)。

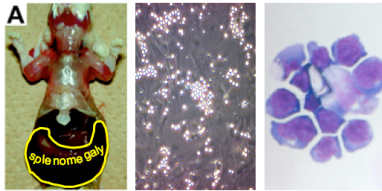


図4. GATA1ノックダウン変異マウスに発症した白血病細胞から樹立した細胞株(GAK14)

(6) ヒト *Gata1* 遺伝子座を有する BAC DNA に対して、白血病細胞においてみられた変異を導入し、トランスジェニックマウスを作成した後、*Gata1* ノックアウトマウスに交配する。そして、ヒト変異型 GATA-1 にて生存するマウスの表現型を解析することにより、その変異ヒト GATA-1 の機能を明らかにする (図 5)。

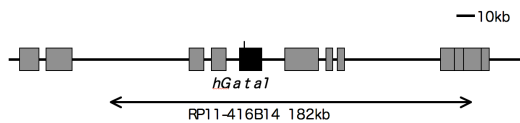
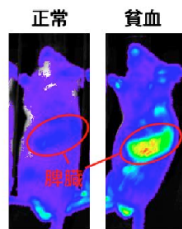


図5 ヒトGATA-1 BACはヒトGATA-1のエキソンを含む182kb.

4. 研究成果

(1) GATA1-BAC-GFP マウスでの GFP 蛍光の発現パターンは、内在性 GATA1 の発現パターンを忠実に再現することが明らかになった。また、GATA1-BAC-GFP マウスでの GFP 蛍光と血液細胞表面マーカーの組み合わせにより、赤血球系前駆細胞を分化段階ごとに分離する方法を確立した (図 6)。

図6 *Gata1*BAC 遺伝子制御下にルシフェラーゼ (Luc) を発現するマウスを用いて、正常時および貧血時の Luc 活性をマウス用ルミノメーター Xenogen IVIS で観察した



(2) BAC トランスジェニックマウスを用いた解析から、*Gata1* 遺伝子の 2 つの制御領域 (G1HE と dbGATA) は、いずれも未分化な前駆細胞において *Gata1* 遺伝子発現に必須であることが明らかになった。

(3) *Gata1* 遺伝子を含む X 染色体上において、G1HE もしくは dbGATA の制御領域を欠失させたマウスでは、赤血球系造血前駆細胞における GATA1 の発現量が低下することを明らかにした。

(4) そのためこれらの制御領域変異マウスでは、未分化な造血前駆細胞の分化が障害され、異常に蓄積する現象が認められた。また、それに伴って末梢血での貧血を生じることが分かった (図 7)。

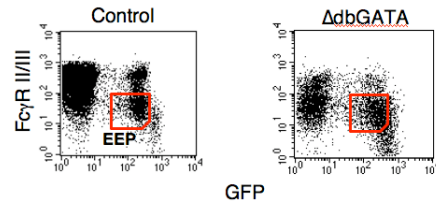


図7. G1BAC-GFPを利用した赤血球前駆細胞の分離. Δ dbGATA マウスでは早期赤血球前駆細胞 (EEP) の異常な蓄積がみられる。

(5) さらに、*Gata1* 遺伝子座では、通常は不活性化されている潜在的な転写開始点や制御領域が、G1HE もしくは dbGATA 領域を欠失させることにより代償的に活性化される現象が観察された。

(6) 潜在的転写開始点の活性化により、白血病症例にみられるアミノ末端が欠失した変異型 GATA-1 が生じるような転写産物の発現が観察された。この現象は *Gata1* 遺伝子制御領域の変異による変異タンパク質の発現が、血液疾患の発症を惹起する可能性を示唆する。

(7) ChIP on Chip 解析により約 2700 の GATA 因子標的遺伝子が明らかになった。それらの結合配列は 3 つのパターンに分類されることが明らかとなった。第 1 のパターンは、GATA-2 のみが結合するサイト。第 2 のパターンでは GATA-2 および GATA-1 の両方が結合するサイト。第 3 のパターンは、GATA1 のみが結合するサイトである。これら 3 パターンの GATA 因子結合サイト周囲の DNA 配列の解析から、それぞれのパターンに特徴的な他の転写因子の結合サイトの存在が明らかとなった。

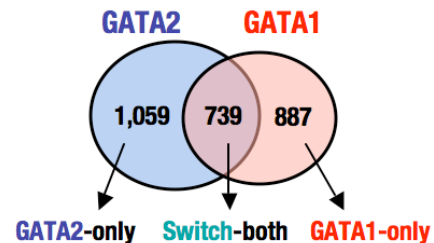


図8. CHIP on chip 解析により、GATA 因子結合サイトは 3 つのパターンに分類された。

(3) 変異型ヒト GATA1 は野生型 GATA-1 とほぼ同程度に、GATA1 欠失細胞株の分化を進行させた。一方、野生型ヒト *Gata1* 遺伝子を有する BACDNA は *Gata1* 欠失マウスの致死性を完全にレスキューできることが明らかとなった。現在、変異型ヒト GATA-1 を有する BACDNA による *Gata1* 欠失マウスのレスキュー実験が進行中であり、この解析により変異型 GATA1 による白血病発症のメカニズムの一端が明らかになると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Nakamura M, Hamada M, Kusakabe M, Hasegawa K, Suzuki H, Greaves, DR, Moriguchi T, Kudo T, Takahashi S. c-Maf is essential for F4/80 expression in macrophages *in vivo*. *Gene* in press. 査読有り
2. Maeda A, Moriguchi T*, Hamada M, Kusakabe M, Fujioka Y, Nakano T, Yoh K, Lim K-C, Engel JD, Takahashi S. Transcription factor GATA-3 is essential for lens development. *Dev Dyn* in press. *correspondence author. 査読有り
3. Moriguchi T, Suzuki M, Engel JD and Yamamoto M. GATA1 and GATA2 function in hematopoietic differentiation. *Hematopoietic Stem Cell Biology*. The Human Press Inc. in press. 査読有り
4. Suzuki M, Moriguchi T, Ohneda K and Yamamoto M. Differential Contribution of the *Gata1* Gene Hematopoietic to Erythroid Differentiation. *Mol Cell Biol*.29: 1163-1175. 2009. 査読有り
5. Moriguchi T, Lim, K-C, and Engel, J. D. Transcription Factor Networks Specify Sympathetic and Adrenal Chromaffin Cell Differentiation. *Functional Development and Embryology*. 1: 130-135. 2007. 査読有り
6. Hasegawa SL, Moriguchi T, Rao A, Kuroha T, Grosveld F, Engel JD and Lim KC. GATA-3 is required for definitive nephrogenesis. *Dev Biol*. 301: 568-577. 2007. 査読有り

[学会発表] (計7件)

1. 森口 尚. Gata1 遺伝子発現制御領域の血球分化段階特異的な機能的貢献. 遺伝情報 DECODE 湯沢ワークショップ (新潟). 2009/1/19.
2. 森口 尚、鈴木未来子、山本雅之. Differential contribution of GATA1 hematopoietic enhancer to erythroid differentiation. 第31回日本分子生物学

会年会 (神戸). 2008/12/9.

3. Moriguchi T, Suzuki M and Yamamoto M. GATA-1 hematopoietic enhancer confers its early erythroid progenitor-specific regulation. 16th Annual Hemoglobin Switching Conference (モントレー、カリフォルニア). 2008/10/11.
4. Moriguchi T, Suzuki M and Yamamoto M. Differential contribution of GATA1 hematopoietic enhancer to erythroid differentiation (山梨). The 21st Naito Conference. 2008/6/24
5. 森口 尚、鈴木未来子、山本雅之. Differential contribution of GATA1 hematopoietic enhancer to erythroid differentiation. DECODE 湯沢ワークショップ (新潟). 2008/1/21.
6. Moriguchi T, Suzuki M and Yamamoto M. High affinity double GATA-binding site is indispensable for proper erythroid development. The 2nd JST-ERATO symposium (つくば). 2007/12/21.
7. Moriguchi T, Suzuki M and Yamamoto M. GATA-1 hematopoietic enhancer confers its early erythroid progenitor-specific regulation. National University of Singapore-Tohoku University/Centre of Excellence Joint Symposium (シンガポール). 2007/9/5.

[その他]

<http://dmbc.med.tohoku.ac.jp/official/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森口 尚 (MORIGUCHI TAKASHI)
東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：10447253