

平成 21 年 4 月 2 日現在

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2007~2008

課題番号:19790149

研究課題名(和文) 血液・血管の発生分化機構と生体内動態の解明

研究課題名(英文) Transcriptional regulation of a myeloid-lineage specific gene lysozyme C during zebrafish myelopoiesis

研究代表者

北口 哲也 (KITAGUCHI TETSUYA)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開発チーム・客員研究員

研究者番号:60432374

研究成果の概要:

赤血球、リンパ球系細胞、ミエロイド系細胞など異なる機能を有する血液細胞は、共通の造血幹細胞から発生してくると考えられているが、その分子メカニズムは十分に理解されていない。私はミエロイド系細胞がどのような転写因子により制御され発生分化してくるのかをミエロイド特異的遺伝子である lysozyme C のプロモーターを用いて、さまざまな転写因子の強制発現と機能阻害をすることにより明らかにした。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード:発生学・形態形成学

## 1. 研究開始当初の背景

血液細胞は、赤血球、リンパ球、マクロファージ、血小板などまったく異なった機能を有する細胞で構成されており、造血幹細胞というたった一つの前駆細胞から分化し形成される。発生初期の造血は血島とよばれる組織で行われることが知られているが、将来赤血球になるエリスロイド系の細胞と将来マクロファージや好中球になるミエロイド系の細胞は造血幹細胞という同一の細胞に由来するにも関わらず、その血島内の異なる場所から発生分化してくることがゼブラフィッシュ(以下ゼブラ)において示されており、

マウスなどの哺乳類においても同様のメカニズムの存在の可能性が示唆されている。しかし、なぜエリスロイド系とミエロイド系の血液細胞が異なる場所で発生分化してくるのか、どのようなメカニズムで異なる場所に移動していくのか、そしてその異なる場所でどのようにして血液細胞としての特徴を獲得していくのか、まったくわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

私は上記の疑問を解決するために、血液細胞の転写因子による発生分化調節機構を明

らかにすることを考えた。そこで私はまずミエロイド系細胞の発生分化に注目し、その転写制御機構の分子メカニズムを解明することにより、その一端を明らかにできると考え、本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究ではミエロイド系細胞を蛍光タンパク質で標識し、その分化過程における移動を追跡し、細胞分化に関わっている転写因子の強制発現や機能阻害などと組み合わせることにより、分化メカニズムを明らかにする。また、蛍光タンパク質を細胞特異的プロモーターの制御下で発現させるために、トランスジェニック動物作製が必要である。したがってトランスジェニック動物の作製が容易であるゼブラフィッシュを使用する。

### 4. 研究成果

まずミエロイド系細胞を標識するために、ゼブラフィッシュゲノムDNAよりミエロイド系細胞特異的な遺伝子である lysozyme C 遺伝子 (lyz) の上流の領域 2.4kb を PCR により単離した。そのフラグメントを EGFP の上流につなぐコンストラクトを作製し (図 1A)、ゼブラフィッシュに一過性に導入したところ、yolk 上に斑点状に存在する細胞が標識された (図 1B 左)。この細胞は lyz の in situ で見られる結果と同様であることから、この上流 2.4kb で lyz の発現様式を発揮することが可能であると考えられた。次にこの 2.4kb のフラグメントの欠失変異体を作製することにより、ミエロイド系細胞特異的発現に重要な役割を果たしている cis-element を同定することにした。2.4kb から 0.5kb にわたる欠失変異体を作製し、ゼブラフィッシュに一過性に発現させ、yolk 上に存在する細胞の数をカウントしたところ、1.7kb より短いプロモーターで細胞数が急激に減少することが判明した (図 1B 右、1C)。このことから、この 1.9kb と 1.7kb の間に発現に重要な領域が存在すると考えられた。

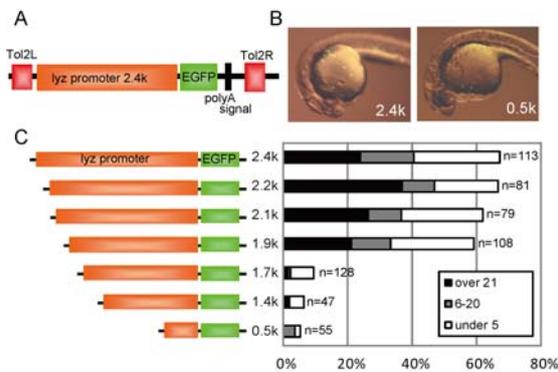


図 1 lyz プロモーターによる調節

次にこの領域 1.9k-1.7kb をより詳細に解析することにした。この領域を転写因子の element 解析すると 3ヶ所の C/EBP ファミリーの結合領域の候補 (図 2A 赤) と、1つの Runx ファミリーの結合領域の候補 (図 2A 青) が確認できた。それぞれの結合領域の候補を含むように欠失変異体を作製し、ゼブラフィッシュに一過性に発現させたところ 1.74kb と 1.69kb の間に発現に重要な役割を果たしている領域が存在していると考えられた (図 2B)。この領域には Runx ファミリーの結合領域が存在し、Runx ファミリーが lyz の発現に重要な役割を果たしていると考えられた。

lyz の 2.4kb の配列には 13ヶ所の C/EBP ファミリーの候補結合領域、2ヶ所の Runx ファミリーの候補結合領域、1ヶ所の ets ファミリー結合領域が存在した。その中より相同性の高い配列を持つ、C/EBP ファミリー 2ヶ所、Runx ファミリー 1ヶ所、ets ファミリー 1ヶ所の欠失変異体を作製し、それぞれの役割を検討したところ、1.70kb の Runx ファミリーの結合領域と、1.46kb の C/EBP ファミリー結合領域が重要な役割を果たしていることが判明した (図 2C)。またこの結合を DNA pull down で検討したところ、runx1 と c/ebp1 がその配列に結合していた (図 2D)。

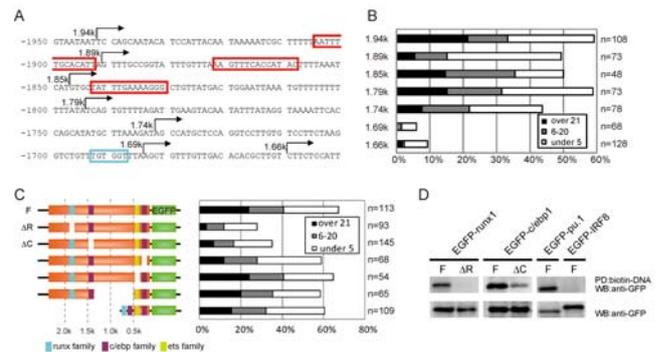


図 2 lyz プロモーターのより詳細な解析

lyz のプロモーター発現制御には runx1 と c/ebp1 が重要な役割を果たしていることがこれまでの in vitro のアッセイで明らかになったが、本当に生体内でも同様であるかどうかをゼブラフィッシュ胚を用いて検討した。転写因子の runx1、c/ebp1、pu.1 のモルフオリノをインジェクションすることにより、それぞれの遺伝子の機能阻害をし、lyz の発現を in situ ハイブリダイゼーションにより検討したところ、runx1、c/ebp1、pu.1 の機能阻害により lyz の発現が抑制された (図 3A-D)。次にそれぞれの転写因子の階層性を検討したところ、pu.1 の機能阻害により、runx1、c/ebp1 の発現は抑制されたが、runx1、c/ebp1 の機能阻害により、pu.1 の発現は抑制されなかったことから、pu.1 が runx1 と c/ebp1 の上流で機能していることが考えら

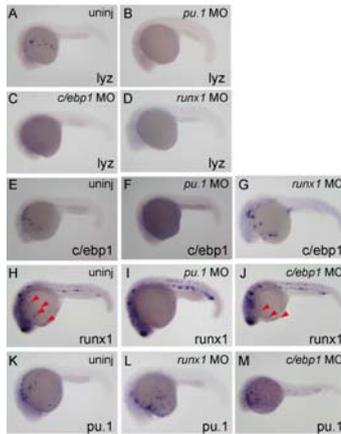


図3 *lyz* の転写因子による調節およびその機能的階層性

れた (図 3E-M)。

*runx1*, *c/ebp1*, *pu.1* の機能阻害により *lyz* の遺伝子の発現が抑制されたが、これが転写因子の強制発現でも同様の結果が得られるか検討した。つまり、これらの転写因子が必要だけでなく、十分であるかどうかを検討した。*runx1*, *c/ebp1*, *pu.1* それぞれ単独の強制発現では *lyz* を ectopic な発現は生じなかったが、これらの3つの転写因子を同時に強制発現したところ、強い *lyz* の発現が見られた (図 4A)。またこの発現は ICM にも見られた。したがって、*lyz* の発現にはこれらの転写因子の協調的な機能が必要だと考えられ

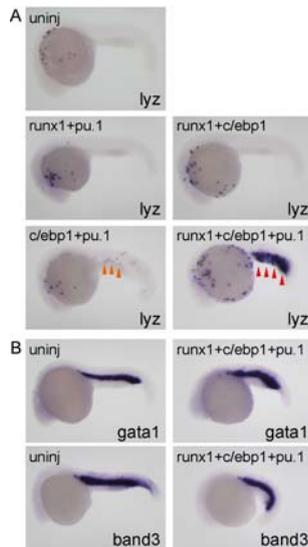


図4 *runx1*, *c/ebp1*, *pu.1* の協調的発現制御

た。またこのとき赤血球系マーカーの *gata1*, *band3* とも発現の変化は認められなかった。(図 4B)。

図1、図2の結果より、2.4kbで *lyz* の発現制御と同様な発現様式を持つことから、トランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、*lyz* 陽性細胞 (ミエロイド系細胞) の動態とその機能について解析した。*lyz* プロモーター2.4kbにEGFP遺伝子を結合したトランスジェニックゼブラフィッシュは *lyz* の発現の始まる20hpfでEGFPの発現をスタートし、そのあと3dpfでも発現が維持されていた (図5A, B)。このときのミエロイド系細胞を15秒ごとに1時間タイムラプス撮影したところ、血管内ではなく、組織内をパトロールするように移動している様子が観察できた。そしてこのEGFPの発現が内在性の *lyz* と一致するかどうか検討したところ、100%一致していた (図5C-E)。発現様式のみならず、発現制御機構も *lyz* と同様であるかを検討した。

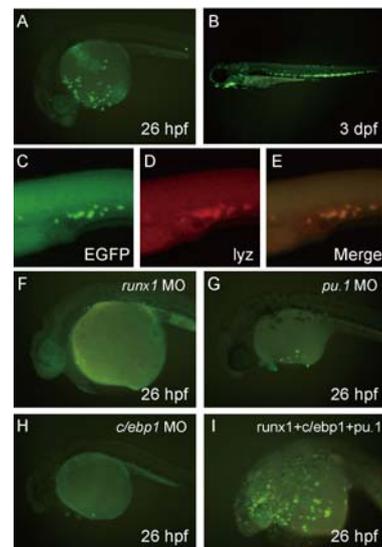


図5 *lyz*:EGFP トランスジェニックゼブラフィッシュ

*runx1*, *pu.1*, *c/ebp1* の機能阻害によりEGFPの発現が抑制され (図5F-H)、この3つの転写因子を同時に発現したときにEGFPを発現する細胞の増加が見られた (図5I)。これらの結果は *in situ* ハイブリダイゼーションによる内因性の *lyz* の発現制御と同じであり、このトランスジェニックゼブラフィッシュが *lyz* 遺伝子の発現制御機構も反映していると考えられた。

最初に述べたようにエリスロイド系細胞とミエロイド系細胞は異なった場所から産生してくることが知られているが、それはそれぞれの転写因子の相互阻害により制御されていることが知られている。そこで、今回使用しているミエロイド系転写因子の *runx1*, *pu.1*, *c/ebp1* とエリスロイド系転写因子 *gata1*, *bik1f* との相互作用を検討した。*bik1f* と *gata1* の機能阻害されたゼブラフィッシュ胚ではミエロイド系転写因子の発現が本来

は発現しない ICM で観察された (図 6A-P)。またこの発現は先ほど報告したトランスジェニックゼブラフィッシュでも同様であった (図 6Q, R)。また逆に pu.1 と c/ebp1 の機能阻害により、gata1 の発現が本来発現しない ALPM で観察することができた (図 6S, T)。

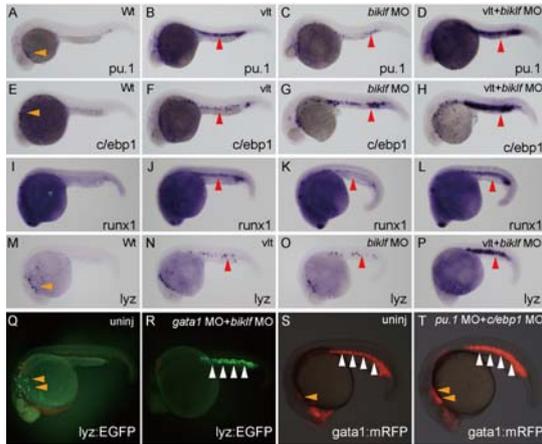


図 6 ミエロイド系転写因子とエリスロイド系転写因子の相互阻害

以上の結果をまとめると図 7 のようになる。lyz プロモータ 2.4kb にはミエロイド系転写因子の runx1、c/ebp1、pu.1 の結合領域があり、その機能階層性を明らかにした。またこれらミエロイド系転写因子はエリスロイド系転写因子の gata1、bik1f と相互に阻害することにより、解剖学的に異なった場所から発生してくることが明らかになった。

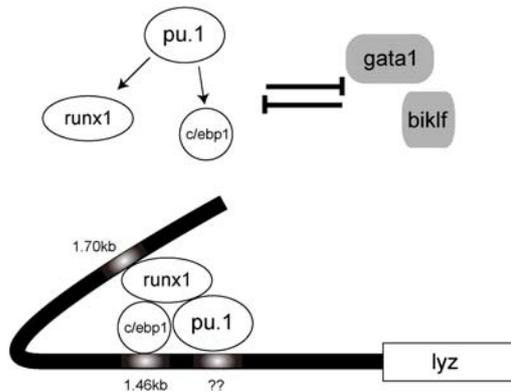


図 7 lyz の発現制御とミエロイド系転写因子とエリスロイド系転写因子の関係

## 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 1件)

Tetsuya Kitaguchi, Koichi Kawakami and Atsuo Kawahara. Transcriptional regulation of a myeloid-lineage specific gene lysozyme C during zebrafish myelopoiesis. Mech Dev, (2009) in press. 査読あり

[学会発表] (計 1件)

北口哲也、川原敦雄「ゼブラフィッシュの一次造血におけるミエロイド系細胞の発生機構」第12回小型魚類研究会、平成18年9月、三島

[図書] (計 2件)

① 北口哲也 東京大学出版会 図説生物学「膜電位発生の仕組み・イオンチャネル」(2009) 印刷中

② 北口哲也 東京大学出版会 図説生物学「神経細胞の構造、様々な形態・シナプスと興奮伝達の制御」(2009) 印刷中

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

北口 哲也 (KITAGUCHI TETSUYA)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開発チーム・客員研究員

研究者番号：60432374

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし