

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790269

研究課題名（和文） 大腸菌人工染色体トランスジェニックマウスを用いた GATA2 遺伝子制御解析

研究課題名（英文） Analysis of GATA2 gene regulation using bacterial artificial chromosome transgenic mice

研究代表者

鈴木 未来子（SUZUKI MIKIKO）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80508309

研究成果の概要（和文）：本研究では、大腸菌人工染色体（BAC）トランスジェニックマウスを用いることにより、*Gata2* 遺伝子上流 77 kb という遠距離に存在する GATA 因子結合領域が造血前駆細胞における *Gata2* 遺伝子のエンハンサーであることを示した。3q21q26 症候群にみられる染色体転座/逆位において、このエンハンサーは原がん遺伝子である *EVII* 遺伝子に近接する。そこで、このエンハンサーの *EVII* 遺伝子活性化における貢献を解析するため、3q21q26 転座/逆位アリルを再現する BAC トランスジェニックマウスを作製し、解析中である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that a GATA binding element located at 77 kb upstream of *Gata2* gene is an enhancer of *Gata2* gene in hematopoietic progenitors using bacterial artificial chromosome (BAC) transgenic mice. The -77 enhancer is close to protooncogene *EVII* in translocated/inverted alleles between 3q21 and 3q26 in 3q21q26 syndrome. Therefore, we generated transgenic mice harboring a BAC transgene recapitulating the 3q21q26 inversion allele in order to examine contribution of the -77 enhancer to the *EVII* gene overexpression in 3q21q26 syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：GATA2・大腸菌人工染色体・トランスジェニックマウス・3q21q26 症候群・白血病・骨髄異形成症候群

1. 研究開始当初の背景

次世代高速シーケンサーの登場により、DNA 配列決定技術は驚異的な進歩を遂げ、様々な疾患に関する DNA 配列変異が特定されている。特に、ゲノム全体の解析が可能となったため、様々な疾患の責任領域がタンパ

ク質のコード領域だけでなく、その外側の遺伝子制御領域にも次々と見つかっていることは注目に値する。今後は、これらの領域が制御している標的遺伝子の同定、およびその制御メカニズムを明らかにすることが疾患発症機構の解明、新たな治療法の開発におい

で重要になると考えられる。当然、高速シーケンサーを用いた網羅的な解析データのみでは、病態生理との関連を明らかにすることは難しい。そこで、制御領域に存在する DNA 変異が生理機能に与える影響を解析する評価系の開発が非常に重要となる。

疾患に関連する遺伝子制御領域の変異・多型の機能解明、さらに当該疾患の治療法開発のためには、動物個体を用いた遺伝子発現制御解析が必要である。そのために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) などのレポーターを発現するトランスジェニックマウスが用いられてきているが、10 kb 程度の短いプラスミド DNA 構築を用いる解析法では、プロモーター付近の制御領域しか解析できないこと、さらに挿入されたゲノム上の周辺配列の影響 (位置効果) を受けやすいことが難点であった。これらを克服するために、我々は大腸菌人工染色体 (BAC) クローンを用いた GFP レポータートランスジェニックマウスを解析に取り入れた。BAC は 200 kb 程度の DNA を挿入することができるベクターであり、このため遺伝子から遠い距離にある領域も解析することができる。また、広範囲の DNA を含むために、トランスジーンが挿入されたゲノムの周辺配列からの位置効果を受けにくいという利点もある。

本研究では、*Gata2* 遺伝子の遠距離エンハンサーをモデルとして、BAC トランスジェニックマウスを用いた動物個体レベルの解析を行うことによって、新しい遺伝子制御解析法の確立を目指す。転写因子 GATA2 は、造血幹細胞および前駆細胞に強く発現しており、それらの細胞の維持に重要な因子である。造血前駆細胞では、GATA2 による *Gata2* 遺伝子の自己活性化がみられるが、赤血球へ分化する際には、同じ GATA 転写因子ファミリーの GATA1 により発現が抑制される。以前の *Gata2* 遺伝子周辺領域の網羅的クロマチン沈降法 (ChIP-Chip) 解析から、*Gata2* 遺伝子上流 77 kb 領域に GATA1 および GATA2 共通の結合部位 (-77 領域) が同定されている (Grass et al., MCB, 2006)。この領域はヒト、マウス間で高度に保存されており、*Gata2* 遺伝子のエンハンサーであることが予想された。しかしながら、*Gata2* 遺伝子から遠い距離に位置しているために、機能的な証明が困難であった。そこで、本研究では、BAC トランスジェニックマウスを用いて、この領域のエンハンサー機能を解析することにした。

興味深いことに、-77 領域 (3 番染色体長腕 21 領域 : 3q21) の下流には、骨髄異形成症候群および急性骨髄性白血病を呈する 3q21q26 症候群にみられる染色体転座/逆位の切断点が集中して存在する。これらの切断点から *EVI1* 遺伝子近傍の 3q26 と結合し、

EVI1 遺伝子の過剰発現が誘導される。この現象から、-77 領域が存在する 3q21 側は *EVI1* 遺伝子に対するエンハンサーとして働いていることが推測されるが、このエンハンサーの実体は分かっていない。そこで、我々は、この染色体転座/逆位による *EVI1* 遺伝子の過剰発現に -77 領域が関与しているのではないかという仮説を立て、転座/逆位をおこした遺伝子座において、*EVI1* 遺伝子の活性化に対する -77 領域の機能的貢献を解析する。

2. 研究の目的

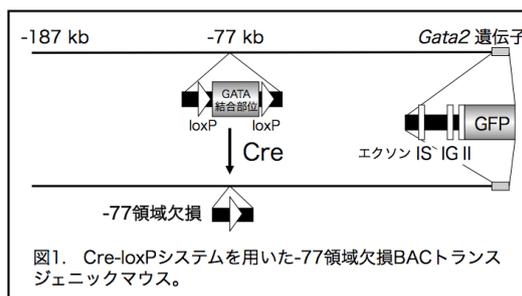
(1) BAC トランスジェニックマウスを用いて、造血前駆細胞における *Gata2* 遺伝子上流 77 kb に位置する制御領域の貢献を明らかにする。

(2) ヒト 3q21q26 症候群でみられる転座/逆位を再現する BAC トランスジェニックマウスを作製し、3q21 側のエンハンサーによる *EVI1* 遺伝子活性化機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Gata2* 遺伝子-77 領域のエンハンサー機能解析

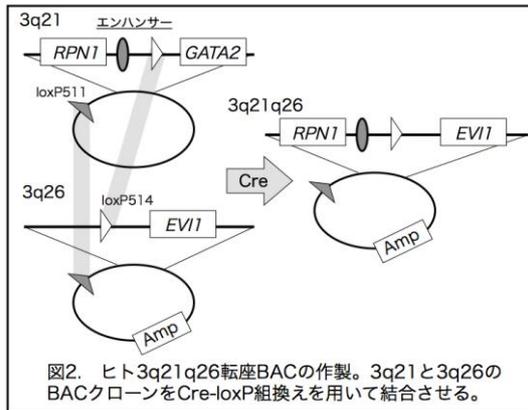
マウス *Gata2* 遺伝子コード領域に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を挿入することで *Gata2* 遺伝子の発現を蛍光でモニターする BAC トランスジェニックマウス (*Gata2* BAC マウス) を作製した (図 1)。このトランスジーン内の -77 領域の両側には、loxP 配列が挿入されており、組換え酵素 Cre を発現させることによって、-77 領域を欠失できるようにした (図 1)。このマウスと全身性に Cre を発現する *Ayu1-Cre* マウスとの交配によって得られた -77 領域欠失マウスの血球において、GFP 蛍光強度を観察し、-77 領域のエンハンサー機能について解析した。



(2) 3q21q26 転座/逆位による *EVI1* 遺伝子発現制御機構の解析

3q21q26 症候群の染色体逆位切断点 3q21 側および 3q26 側のヒトゲノム領域をそれぞれ含む BAC クローンを入手し、相同組換えによって切断点に lox514 配列を挿入した (図 2)。この lox514 配列と BAC ベクターに元々挿入されている lox511 配列を利用して、大

腸菌内で Cre-lox 組換えを行った (図 2)。これにより、二つの BAC クローンを連結させ、染色体逆位を再現する BAC クローンを作製した (図 2)。この BAC クローンをを用いてトランスジェニックマウス (3q21q26 マウス) を作製し、*EVI1* 遺伝子の発現とそれによる血球の表現型を解析した。さらに、-77 領域の貢献を解析するために、-77 領域を欠失させた BAC クローンを作製した。

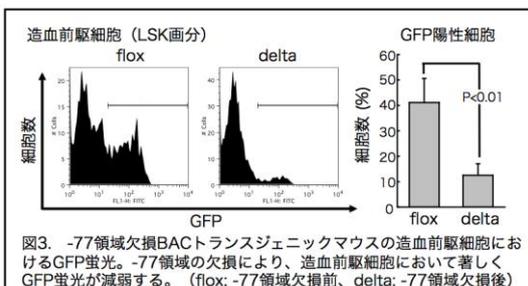


4. 研究成果

(1) *Gata2* 遺伝子-77 領域のエンハンサー機能解析

*Gata2*BAC マウスでは、造血組織、神経において GFP の強い蛍光が観察された。造血組織においては、造血幹細胞と未熟な造血前駆細胞を含む Lineage (-) Sca1 (+) c-Kit (+) (LSK) 画分において GFP の蛍光が観察された。一方で、分化した造血細胞では、GFP の発現は抑制されていた。この発現パターンは内在性 *Gata2* 遺伝子の発現パターンと類似していることから、*Gata2*BAC マウスでは、内在性 *Gata2* 遺伝子の造血組織における発現を再現できたといえる。

次に-77領域を欠失させた *Gata2*BAC マウスにおいて、同様に造血組織における GFP 蛍光を観察した。-77領域欠損 *Gata2*BAC マウスでは、LSK 画分における GFP 蛍光が著しく減少していた (図 3)。このことから、-77領域が造血前駆細胞における *Gata2* 遺伝子のエンハンサーとして機能していることが明らかになった。

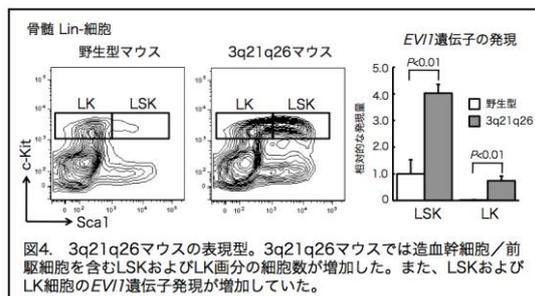


(2) 3q21q26 転座/逆位による *EVI1* 遺

子発現制御機構の解析

3q21q26 マウスでは、造血組織特異的に *EVI1* 遺伝子の高発現がみられた。さらに骨髄中の血球では、造血幹細胞および前駆細胞に強い発現が観察された (図 4)。この *EVI1* 遺伝子の高発現は、*EVI1* 遺伝子周辺のみを含み、3q21 側を含まない BAC トランスジェニックマウスでは観察されなかった。これらの結果から、-77 領域を含む 3q21 側に造血組織特異的なエンハンサーが存在することが示された。現在は、-77 領域が 3q21 側に含まれるエンハンサーの本体であるかどうかを検証するために、-77 領域を欠失させた 3q21q26 マウスを作製し、*EVI1* 遺伝子の発現を解析している。

さらに、この 3q21q26 マウスが、3q21q26 症候群の表現型を再現するかを解析した。3q21q26 マウスの末梢血では、貧血と血小板増多が観察された。このマウスの骨髄では、LSK 画分の細胞数が増加しており、白血病発症の前段階ではないかと予想された (図 4)。3q21q26 マウスの白血病発症については、現在、マウスを長期飼育し、観察している。これらのことから、3q21q26 マウスは、3q21q26 症候群の病態を少なくとも一部は再現しているといえる。今後、このマウスが発現制御機構の解析のみならず、3q21q26 症候群の発症機構の解析に利用できるかと期待される。



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 2 件)

- ① Suzuki, M., Shimizu, R. and Yamamoto, M. 2011. Transcriptional regulation by GATA1 and GATA2 during erythropoiesis. *Int. J. Hematol.* 93: 150-155. (査読あり)
- ② Takayama, M.*, Fujita, R.*, Suzuki, M.*, Okuyama, R., Aiba, S., Motohashi, H. and Yamamoto, M. 2010. Genetic analysis of hierarchical regulation for Gata1 and NF-E2 p45 gene expression in megakaryopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* 30: 2668-2680. (査読あり) *co-first author

〔学会発表〕(計7件)

① 鈴木未来子、山崎博未、清水律子、James Douglas Engel、山本雅之。大腸菌人工染色体を用いた新しい白血病染色体転座／逆位モデルマウスの構築。造血器腫瘍研究会。2012年1月28日。築地。

② Suzuki M., Yamazaki H., Mukai HY., Motohashi H., Shi L., Tanabe O., Engel JD. and Yamamoto M. Hereditary persistence of fetal hemoglobin is associated with disruption of the HBS1L-MYB locus. 日本分子生物学会年会。2011年12月14日。横浜。

③ 鈴木未来子、向井陽美、山崎博未、本橋ほづみ、James Douglas Engel、山本雅之。HBS1L-MYB 遺伝子間領域の変異が巨核球／赤血球運命決定異常と高胎児ヘモグロビン症を誘発する。細胞運命制御 若手の会。2011年9月24日。軽井沢。

④ Suzuki M. and Yamamoto M. Genome-wide analysis of GATA1 and GATA2 occupancy indicates GATA-factor switching during erythroid differentiation. Joint Minisymposium of EB Platforms and NM-GCOE. 4, February, 2011. Sendai, Japan.

⑤ Suzuki M., Mukai HY., Motohashi H., Engel JD. and Yamamoto M. Hereditary persistence of fetal hemoglobin and the HBS1L-MYB locus. 5th International Symposium on GATA factors. 19, November, 2010. Sendai, Japan.

⑥ Suzuki M., Mukai HY., Motohashi H., Engel JD. and Yamamoto M. A novel mouse model of hereditary persistence of fetal hemoglobin associated with HBS1L-MYB intergenic region. JSH International Symposium. 16, July, 2010. Akita, Japan.

⑦ Suzuki M., Mukai HY., Motohashi H., Engel JD. and Yamamoto M. A mouse model of hereditary persistence of fetal hemoglobin associated with HBS1L-MYB intergenic region. The 17th Hemoglobin Switching Conference. 4, September, 2010. Oxford, UK.

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 未来子 (SUZUKI MIKIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80508309

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：