

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860731

研究課題名(和文)血球分化障害をきたす機能未知の遺伝子の解析

研究課題名(英文)Analysis of an uncharacterized gene essential for hematopoietic development

研究代表者

徳永 正浩(TOKUNAGA, MASAHIRO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90597410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、ある新規遺伝子のホモ変異ES細胞株が著しい血球分化障害を示すことを見出しており、本課題においてはこの遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス(以下cK0マウス)を作製してその表現型を解析した。Vav1-creを使用したcK0マウスは胎生後期に著大な貧血を示し致死であった。胎生14.5日肝においては赤芽球の減少を認め、造血幹/前駆細胞分画のコロニー形成能が著名に低下していた。この遺伝子産物は核蛋白であり、変異型細胞において細胞周期制御やアポトーシスに關与する遺伝子の発現上昇を認めた。さらに、cK0マウスの胎生14.5日肝由来の造血幹/前駆細胞は培養中にアポトーシスを認めた。

研究成果の概要(英文)：Using our previously established homozygous mutant mouse ESC bank, we performed in vitro differentiation screening assays. We identified a previously uncharacterized gene, which we named *Ahed*, whose null mutant ESCs showed the attenuated production of blood cells during hematopoietic differentiation. This observation was substantiated by hematopoietic cell-specific ablation of *Ahed* by crossing floxed mice with Vav1-cre transgenic mice, which caused fetal anemia from E14.5 onwards, leading to perinatal lethality. E14.5 fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells (LSK cells) from conditional knockout embryos produced less and smaller colonies in a methylcellulose culture. We found that *Ahed* encodes a nuclear protein whose loss induces upregulation of the genes involved in apoptosis and cell cycle arrest. Furthermore, *Ahed*-null E14.5 LSK cells revealed marked apoptosis during culture.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血 新規遺伝子 アポトーシス コンディショナルノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、ヒトを初めとして多くの哺乳動物における全ゲノム配列の決定や、次世代シーケンサーの急速な進歩に伴い、われわれのゲノムに関する知見は劇的に進歩している。ヒトやマウスにおいてタンパク質をコードする遺伝子の同定が急速に進んでおり、その数は2万以上と云われている (Pruitt et al., Genome Res. 2009)。一方、これらの遺伝子の大部分は機能不明であるかアミノ酸配列から推測されているに過ぎず、その役割を明らかにすることが急務となっている。

近年の順遺伝学的手法においては、変異を導入した細胞を表現型によりスクリーニングすることにより、変異遺伝子の同定や機能解析が行われてきた。従来、哺乳動物の細胞は二倍体のため片方のアレルに変異を導入しても、もう片方のアレルによって補完されてしまい、劣性遺伝子のスクリーニングは下等動物に比して困難であった。

(2) 研究代表者が以前に所属していた研究室 (大阪大学大学院医学系研究科 環境・生体機能学教室) は、Bloom 遺伝子を一過性に抑制することにより、マウスホモ変異 ES 細胞ライブラリーを作製してきた (Horie et al., Nat Methods. 2011)。マウス ES 細胞に gene trap vector を用いてゲノムワイドに遺伝子領域に変異を導入後、vector 挿入部位を同定した。Bloom 遺伝子は相同染色体間組換えを抑制する遺伝子で、これを Tet-Off システムにて一過性に抑制することにより通常の 1000 倍の頻度でホモ変異体 が得られる (Yamanishi et al., Genome Res. 2013)。こうして 1 個の遺伝子が両アレル同時にノックアウトされた、ホモ変異体 200 種類からなるライブラリーを得ることができた。

(3) 研究代表者は、この変異マウス ES 細胞株を血球分化を支持するストローマ細胞株である OP9 と共培養することにより、血球の分化・成熟に異常をきたす ES 細胞株のスクリーニングを行った (課題名: ES 細胞ホモ変異体ライブラリーを用いた新規血球分化制御因子の検索、若手 B、代表者: 徳永正浩、H24-25)。このスクリーニングの結果、ある遺伝子の変異株において、血球分化が著しく障害されていることを見出し、この遺伝子を *Ahed* (affected hematopoietic development) と命名した。研究代表者らは引き続き、*Ahed* 遺伝子のノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスは胎生 5.5 日より胚の顕著な成長遅延を認め、胎生 5.5~6.5 日の間で致死であった。

2. 研究の目的

上記の通り、研究代表者の行った解析において *Ahed* 遺伝子の通常のノックアウトマウスは胎生早期に致死であった。原因として、この遺伝子が発生において造血系以外にも

重要な機能を有していると考えられた。一方公開されている発現データにおいて、*Ahed* は他の組織に比して造血細胞で発現が高い。さらに研究代表者はマウス骨髄 c-kit 陽性造血前駆細胞において、RT-PCR で *Ahed* の発現を確認した。

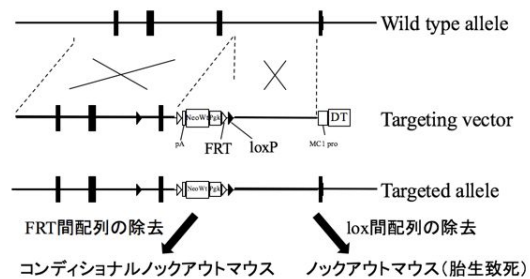
以上より、*Ahed* 遺伝子は造血系の発生もしくは維持において一定の役割を有している可能性が高いと考えられた。よってコンディショナルノックアウトマウスを作製して、その造血系における機能を解析することは有用と考えた。

造血系は多くの遺伝子が精密に制御されることによって成り立ち、これに関係する機能未知の遺伝子を一つでも明らかにすることは、再生医療などの観点より有用と考えられた。

3. 研究の方法

(1) キメラマウスの作製

< 図 1 > に示すターゲティングストラテジーで *Ahed* 遺伝子の第 3 エクソンを lox 配列で挟み込んだ ES クローンを作製した。このクローンから lox 間配列を除去した ES を用いて、上に述べた通常のノックアウトマウスを作製済である。今回、代わりに FRT 間配列を除去した ES を胚にインジェクションすることにより、キメラマウスを作製した。Germline transmission が得られた 2 ラインを用いて、*Ahed*^{fllox/fllox} マウスを作製した。



< 図 1 > ターゲティングストラテジー

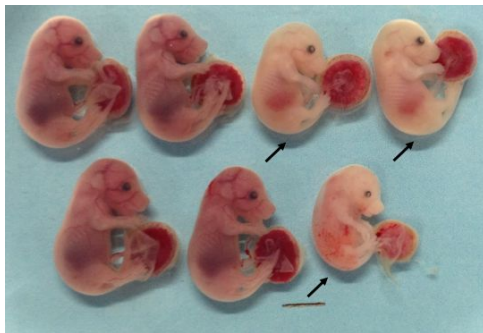
(2) マウスの交配およびコンディショナルノックアウトマウスの解析

Cre 発現マウスとして、*Vav1-cre* トランスジェニックマウスを使用した。*Vav1-cre* トランスジェニックマウスは発生において (胎生 11 ± 0.5 日)、造血系の細胞にほぼ特異的に Cre を発現する。*Ahed*^{+/+}; *Vav1-cre* マウスと上記 (1) にて作製した *Ahed*^{fllox/fllox} マウスを交配すると、1/4 の確率でコンディショナルノックアウトマウス (*Ahed*^{fllox/-}; *Vav1-cre*) が得られ、この遺伝子の造血発生における機能を解析可能である。表現型解析として胎生致死の有無や外形を観察した。さらには胎児肝より造血細胞を採取してその機能を解析した。

4. 研究成果

(1) *Ahed* コンディショナルノックアウトマウスの表現型

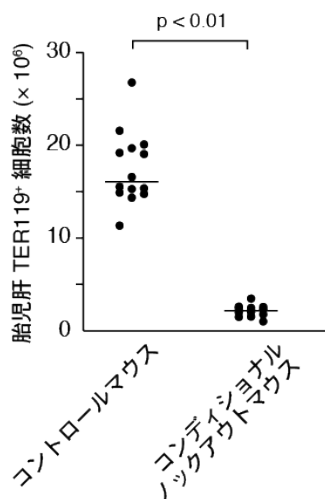
上記研究の方法の項で述べた交配によって得られた新生仔の遺伝子型を解析したところ、コンディショナルノックアウトマウスを認めなかった。よって *Ahed* コンディショナルノックアウトマウスは胎生致死と考え、胚の解析を行った。コンディショナルノックアウト胚は胎生 12.5 日まではその外見に異常を認めなかったが、胎生 14.5 日においては軽度貧血様で、胎児肝の萎縮を認めた。さらに胎生 16.5 日においては<図 2>に示す通り、貧血は顕著となり胚全体の萎縮と皮下浮腫を認めた。以上より、*Ahed* コンディショナルノックアウトマウスは胎生後期に著大な貧血により致死であると結論付けられた。



<図 2> 胎生 16.5 日胚 (矢印がコンディショナルノックアウトマウス)

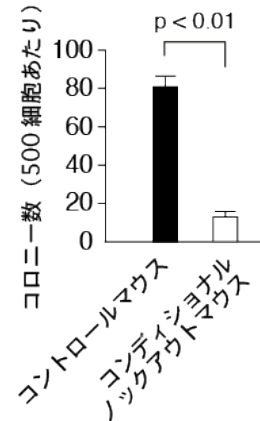
(2) 胎児肝造血細胞の解析

次に研究代表者らは、胎生 14.5 日の胎児肝の造血細胞を回収し、コンディショナルノックアウトマウスにおいて TER119 陽性赤芽球系細胞が有意に減少していることを見出した<図 3>。



<図 3> 胎生 14.5 日肝における赤芽球系細胞数

また胎生 14.5 日肝における造血幹/前駆細胞分画は、コンディショナルノックアウト胚で予想外にもむしろ増加していたが、メチルセルロース上の培養でコロニー形成能が著名に低下していた<図 4>。これらのことから、*Ahed* 遺伝子は胎児造血において必須の役割を果たしていることが示された。



<図 4> 胎生 14.5 日肝の造血幹/前駆細胞を用いたメチルセルロースアッセイ

(3) *Ahed* 遺伝子産物は核蛋白である

研究代表者らは一連の研究の流れの中で、この遺伝子の産物が核蛋白であることを *in vitro* の解析によって見出した。さらには、この蛋白の C 末端側に非典型的な核局在シグナルが複数個存在することを見出した。

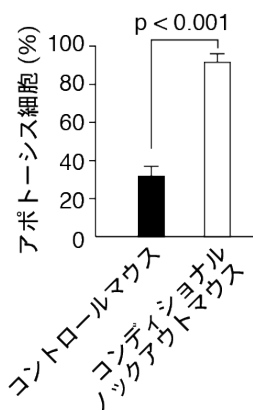
したがって、この遺伝子は核内で種々の遺伝子の発現に影響を及ぼしていると考えられ、野生型細胞と変異型細胞の間で遺伝子発現を比較した。マイクロアレイを用いた解析の結果、変異型細胞において細胞周期制御因子である *p21* やアポトーシスに關与する *Perp* 遺伝子の発現の上昇を認めた。さらに gene set enrichment analysis (GSEA) を行い、変異型細胞においてアポトーシス経路に關わる遺伝子群の発現が濃縮していることを確認した。

(4) *Ahed* コンディショナルノックアウト造血細胞におけるアポトーシス

最後に上記(3)で認めたアポトーシスが、コンディショナルノックアウトマウスにおいても実際に認められるのかを確認した。胎生 14.5 日肝から採取した造血幹/前駆細胞を培養した結果、コンディショナルノックアウトマウス由来の造血細胞においてのみ著明なアポトーシスを観察した<図 5>。したがって、コンディショナルノックアウトマウスにおける表現型(貧血やコロニー形成能の低下)は、アポトーシスによってもたらされていることが強く示唆された。

研究代表者らは一連の研究の中で、造血において必須の役割を担う機能未知の遺伝子を新たに一つ同定し、さらにその *in vivo* に

おける機能をノックアウトマウスを用いた実験により詳細に解析した。この遺伝子の役割は、分子機構という面では現段階で不明な点が多いが、今後明らかとされることを多いに期待する。



< 図 5 > 胎生 14.5 日肝の造血幹/前駆細胞の培養中に認めたアポトーシス

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)

Tokunaga M, Kokubu C, Maeda Y, Sese J, Horie K, Sugimoto N, Kinoshita T, Yusa K, Takeda J (2014). Simulation and estimation of gene number in a biological pathway using almost complete saturation mutagenesis screening of haploid mouse cells. *BMC Genomics* 15, 1016. doi: 10.1186/1471-2164-15-1016. (査読有)

[学会発表](計2件)

Tokunaga M, Kokubu C, Tanaka S, Takeda J (2015). Identification and characterization of a novel nuclear protein that is essential for hematopoietic development. Conference on Transposition and Genome Engineering 2015, November 19th, Nara Kasugano International Forum IRAKA, Nara, Japan.

Tokunaga M, Kokubu C, Takeda J (2014). *In vitro* screening of homozygous mutant mouse ES cells identified a novel gene essential for hematopoietic development. 27th Annual Mouse Molecular Genetics Conference, October 1st, Pacific Grove, CA, USA.

6. 研究組織

(1)研究代表者

徳永 正浩 (TOKUNAGA, Masahiro)

大阪大学 医学部附属病院 医員
研究者番号：90597410

(2)研究協力者

田中 幸代 (TANAKA, Sachiyo)
大阪大学 医学系研究科 特任研究員