

## 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28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790903

研究課題名（和文） L3MBTL1コンディショナルノックアウトマウスを用いた造血および血液疾患の解析

研究課題名（英文） Analysis for hematopoiesis and hematologic diseases by L3MBTL1 conditional knockout mice.

研究代表者

新井 郷子 (ARAI SATOKO)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60422276

研究成果の概要（和文）：L3MBTL1はその機能破綻が白血病等、血液腫瘍発症の原因となる可能性のある分子である。本研究では造血過程におけるL3MBTL1の機能破綻がもたらす影響を生理的に解析することを目的としてL3MBTL1コンディショナルノックアウト作製を試みたがマウスは完成しなかった。また、造血系特異的なL3MBTL1複合体を明らかにするために、HaloTagを付加したL3MBTL1（HaloTag-L3MBTL1）を造血系細胞において発現させそれに結合したタンパク質をマスマスペクトルで解析し結合タンパク質の候補を得た。

研究成果の概要（英文）：It has been supposed that dysfunction of L3MBTL1 may cause hematological diseases. In this study, we propose the construction of L3MBTL1-conditional knock out mouse in which L3MBTL1 can be deleted specifically in the hematopoietic cells to know the function of L3MBTL1 in hematopoiesis. Unfortunately, we could not accomplish generation of the mutant mice. In addition, I performed the pull-down assay by using Halotag-fusion L3MBTL1 protein expressed in human leukemic cell lines to clarify the L3MBTL1-complex in hematopoietic cells, and the candidates for the associated proteins were obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：疾患生命科学

科研費の分科・細目：血液内化学・血液腫瘍学

キーワード：造血、クロマチン制御、血液疾患

## 1. 研究開始当初の背景

L3MBTL1はMBT (Malignant Brain Tumor) という特徴的なドメインを有するポリコーム群タンパク質であるが、その遺伝子座は血球腫瘍において頻回に欠失が見られる染色体座に存在し、その遺伝子の機能破綻は白血病発症の原因と成り得ると考えられていた。また、我々は、同様にMBTドメインを有する類似タンパク質であるMBT-1についてノックアウトマウスを作製、解析したところ、MBT-1は特にミエロイド系および赤血球系の前駆細胞の「分化」の促進を特異的に制御することを見出した。さらにL3MBTL1とMBT-1が互いに結合し、複合体を形成していることを発見し、L3MBTL1やMBT-1の機能異常は、急性(骨髄性)白血病発症のメカニズムに重要な関与がある可能性が強く示唆された。

さらに、我々は、L3MBTL1を欠損した(L3MBTL1<sup>-/-</sup>)ES細胞を作製し、解析を行ったが、これまでに、L3MBTL1を欠損すると分化誘導しても分化せずに、幹細胞の性質を保ったまま増殖し続ける細胞が存在するという大変興味深い結果を得た。もしL3MBTL1が血球分化においても類似の機能をもつとすると、血球の正常な分化に非常に重要な役割を担っていることが示唆されると同時に、その機能破綻が急性白血病等の重大な血液疾患を引き起こす可能性も示唆される。

そこで、L3MBTL1のノックアウトマウスの造血系の解析を試みたが、L3MBTL1ノックアウ

トマウスは胎生早期に致死であった。そのため、造血系のみにおいてL3MBTL1の欠損の解析が可能になるよう、本研究課題において、“コンディショナルノックアウト (KO) 造血系マウス”の構築を考案した。

## 2. 研究の目的

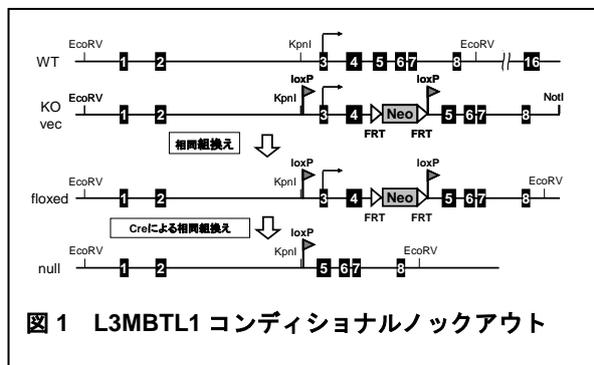
L3MBTL1はヒトにおけるある種の血球腫瘍において典型的な欠失の見られる遺伝子座に位置しており、その機能破綻が白血病等の発症の原因となり得ると考えられている分子である。最近、特異的なヒストン修飾を認識することでエピジェネティカルに遺伝子発現を制御することが注目され始めたが、実際の生理機能については不明な点が多い。本研究では、“L3MBTL1コンディショナルノックアウト造血系マウス”を作製し、目的の系統・分化段階の造血細胞特異的にL3MBTL1を欠損させ、造血過程におけるL3MBTL1の機能破綻がもたらす影響を生理的に解析すると共にそのメカニズムを解明し、今後の血液腫瘍研究の分野に貢献することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) L3MBTL1コンディショナルノックアウトマウスの作製

造血系のみにおいてL3MBTL1の欠損の解析が可能になるよう、本研究課題において、“コンディショナルノックアウト (KO) 造血系マウス”の構築を考案した。これまで、図1に

示すような L3MBTL1-floxed マウスの構築を進めた。



#### (2) HaloTag システムを用いた造血系特異的な L3MBTL1 複合体の解明

L3MBTL1 と結合するタンパク質については報告があるが、造血系では、造血系に特異的な複合体として存在する可能性がある。

L3MBTL1 は血球における発現が弱く、また適した抗体が無い場合、HaloTag を付加した L3MBTL1 (HaloTag-L3MBTL1) を造血系細胞において発現させて lysate から精製し、それに結合したタンパク質をマスマスペクトルで解析した。HaloTag は抗原・抗体反応とは違い、そのリガンドとの結合が共有結合であるため、様々な反応条件に対応が可能である。また、対象とする造血系細胞としては、ヒトヒト血球系細胞株を用い、HaloTag-L3MBTL1 を強制発現させた。

#### 4. 研究成果

(1) L3MBTL1 コンディショナルノックアウトマウスの作製

コンディショナルノックアウトマウスを作製するためのキメラマウスから F1 作製を試みた。しかしながら germ line transmission が得られなかった。何度か試みたがキメラ率が低く、目的を達することができなかった。germ line transmission が成功しない理由として現在使用している ES 細胞が劣化している可能性がある。そのため新しく実績のある ES 細胞を入手するか、もしくはキメラマウス作製を外注することでマウス作製を達成したい。

#### (2) HaloTag システムを用いた造血系特異的な L3MBTL1 複合体の解明

HaloTag-L3MBTL1 を数種類のヒト血球系細胞株 (HL-60 等) に発現させた安定株を得た、その細胞から lysate から精製し、それに結合したタンパク質をマスマスペクトルで解析し、コントロール (HaloTag のみ発現) と比較することで L3MBTL1 に結合しているタンパク質の候補を得た。現在それらについて実際に結合が見られるかどうか、共免疫沈降法等を用いて解析中である。

#### 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)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 郷子 (ARAI SATOKO)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60422276

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし