

## 論文の内容の要旨

論文題目 **遺伝子欠損マウスを用いた転写伸長因子 S-II の発生における機能の解析**

氏名 有光 なぎさ

### [序]

mRNA の伸長反応は鋳型 DNA の配列、構造、誤った塩基の取り込みなど様々な要因により一時停止、もしくは中断してしまうことがある。その場合に転写伸長因子 S-II が転写途中で中断した RNA ポリメラーゼ II と結合し、その RNA ポリメラーゼ II が本来持つ RNA 鎖分解能を促進し安定した中断配列を分解することで RNA ポリメラーゼ II の転写反応を再開させると考えられている。

S-II は真核細胞において酵母からヒトに至るまで広く存在し、多細胞生物では様々な組織に発現している。近年当教室において S-II 欠損酵母は通常培養条件下では増殖可能であるが、6-アザウラシルや酸化ストレスに対して感受性であること、また、マウス S-II は組織特異的転写因子 FESTA や HOX と相互作用することが示唆されている。このことは S-II が他の転写因子との相互作用を介した遺伝子発現制御を行うことにより発生や組織の機能維持に働く可能性を示す。しかしながら多細胞生物の発生における S-II の機能は明らかでない。そこで本研究では S-II 遺伝子欠損マウスの作出を試み、多細胞生物での発生における S-II の必要性を検証した。そして S-II が機能する局面を知るために、S-II 欠損マウスにおいて発現が変化する遺伝子群を解析し赤血球に特異的に発現する複数の遺伝子の発現量が低下していることを見だし、S-II が赤血球産生に必要であることを示唆する結果を得た。

### [方法と結果]

#### **S-II 遺伝子欠損マウスの作出**

S-II がマウスの発生に必須であるかを知るため、S-II 遺伝子欠損マウスの作出を行った。S-II

遺伝子は 10 個のエクソンから構成されている。エクソン 4 の一部を欠失させたターゲットイ

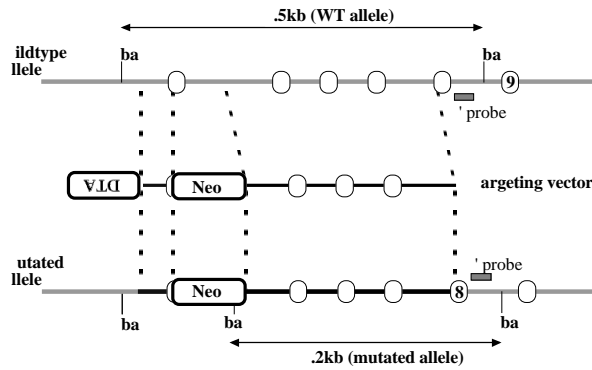


Fig 1. S-II 遺伝子欠損マウスの作出に用いたターゲティングベクターの構造

NEO:ネオマイシン耐性遺伝子、DTA:ジフテリア毒素遺伝子、丸でかこった数字はエクソンを示す。



Fig 2. S-II 遺伝子欠損マウスのサザンブロット法による確認。

ングベクターを用い、heterozygous S-II 遺伝子欠損マウスを作出した (Fig 1,2)。

Heterozygous S-II 遺伝子欠損マウス同士の交配により誕生した仔マウス (4 週齢) の遺伝子型を調べた結果、S-II 遺伝子欠損マウスが存在しないことが判明した。さらに日齢をさかのぼっていくと胎生 16.5 日以降では S-II 遺伝子欠損マウスが存在しないが、胎生 12.5 日胚以前の胚においては、野生型マウス、heterozygous S-II 遺伝子欠損マウス、S-II 遺伝子欠損マウス胚がほぼメンデル則に従って存在することがわかった (Table 1)。

Table 1. S-II 遺伝子欠損マウスの胎生致死性

age	胎児数	遺伝子型		
		+/+	+/-	-/-
11.5日胚	38	10	17	11
12.5日胚	104	28	54	22
13.5日胚	134	31	88	15
14.5日胚	41	14	23	4
16.5日胚	22	8	14	0
18.5日胚	20	6	14	0
4週齢	103	42	61	0

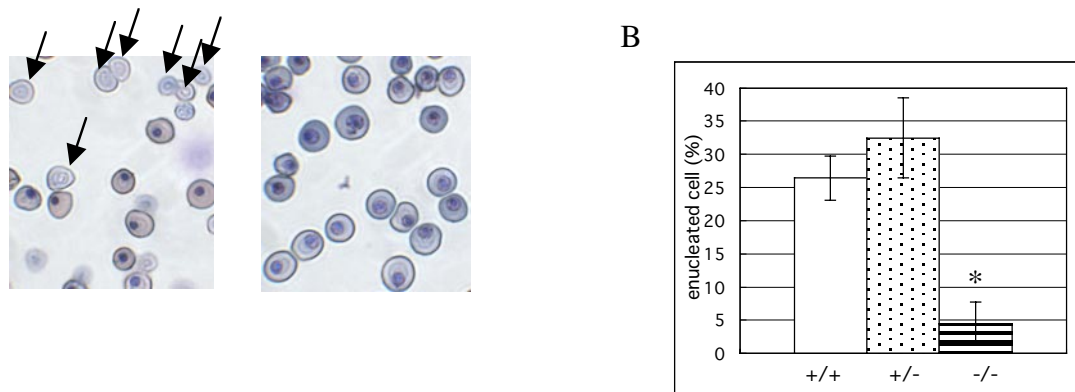


Fig 3. S-II 遺伝子欠損マウス (12.5 日胚) における肝臓 (矢印) の縮小。

従って、S-II 遺伝子欠損マウスは胎生致死であることが明らかとなった。12.5 日胚までは野生型マウス及び S-II 遺伝子欠損マウスの体の大きさには違いが見られないが、13.5 日胚以降、S-II 遺伝子欠損マウスの体の大きさは野生型マウスに比べ小さくなっていた。この時期の造血は主に肝臓で行われており、赤血球のヘモグロビン色素によって肝臓が赤く見えるが、S-II 遺伝子欠損マウスの肝臓は野生型マウスに比べ小さかった (Fig 3)。

### S-II 遺伝子欠損胎児マウスにおける末梢血赤血球の形態

マウスの発生過程において造血の場は初期の胎児型造血を担う卵黄嚢細胞から、胎生中期には成体型造血を行う肝臓に移行し、胎生後期になると骨髄、脾臓に移る。胎生中期の肝臓では主に造血を行っていることから、S-II 遺伝子欠損によって肝臓での造血障害が起きていると考えた。そこで造血異常が見られるか否かについて末梢血の血球形態を観察した。その結果、成体型成熟赤血球である無核赤血球の数が S-II 遺伝子欠損マウスでは減少していることが判明した (Fig 4)。この結果は、S-II が成体型成熟赤血球の正常な発生に必要なことを示している。



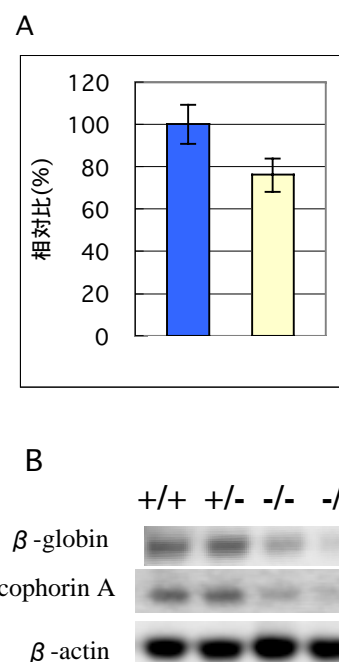
**Fig.4** A.Diff-Quik 染色による末梢血血球形態。矢印は無核赤血球を示す。  
 B.S-II 遺伝子欠損マウスにおける末梢血中の無核赤血球の減少(n=11, P<0.02)

### S-II 遺伝子欠損マウスにおける遺伝子発現の変化

発生、分化時にはそれぞれの分化過程に応じて特異的遺伝子の変化がおこる。造血において S-II が機能する分子機構を知るには、S-II 遺伝子欠損により発現が変化する遺伝子を知ることが有効な手段であると考えた。そこで DNA マイクロアレイの手法を用いて S-II 欠損マウスと野生型マウス間で発現量の異なる遺伝子群の同定を試みた。胎生致死になる直前の 12.5 日の S-II 遺伝子欠損マウス及び野生型マウス胎児全体から RNA を調製し、DNA マイクロアレイ法により遺伝子の発現を網羅的に解析した。

その結果、S-II 遺伝子欠損マウスで発現量が低下している遺伝子が複数見いだされた。このうちの多くが赤血球特異的に発現する遺伝子であり、 $\beta$ -globin などのヘモグロビン関連因子、エリスロポエチンレセプター、band3 などの赤血球膜タンパク質、erythroid Kruppel-like factor 遺伝子及(EKLF)などの赤血球産生時に機能する転写因子が含まれていた。一方、肝細胞の  $\alpha$ -fetoprotein や albumin 遺伝子や、赤血球特異的遺伝子でも発現に差がみられないものがあることを見出した。見出した赤血球特異的遺伝子は多くが肝臓における成体型赤血球産生に関わるものであり、これは S-II 欠損マウスにおいてみられる成体型赤血球が減少する結果と矛盾しない。さらにこれらの遺伝子の発現量が低下していることを定量、半定量 RT-PCR 法及びノザンブロット法により確認した(Fig 5 A,B)。

S-II 遺伝子欠損マウスでは  $\beta$ -globin 遺伝子とその転写因子である EKLF 遺伝子及びエリスロポエチンレセプター遺伝子の減少がみられるが、これらの遺伝子欠損はそれぞれ胎生中期における致死を導くことが報告されている。S-II 遺伝子欠損マウスが胎生中期に致死になるのはこれらの遺伝子の発現量の減少が一因になるのではないかと考えている。



**Fig.5** A,B. S-II 遺伝子欠損胎児肝における赤血球特異的遺伝子の減少。A:定量 PCR 法による EKLF 遺伝子の発現減少(n=6)  
 B:半定量 PCR 法による  $\beta$ -globin, glycophorinA 遺伝子の発現減少(n=4)

## S-II 遺伝子欠損マウスにおける globin の不均衡

EKLF 欠損マウスにおいては胎児型赤血球産生に異常が見られないが、成体型赤血球合成過程で胎児型 globin から成体型  $\beta$ -globin へのスイッチングができず、胎生 14 日付近で致死する。また  $\beta$ -globin は EKLF によりその発現が制御されることが知られているが、 $\beta$ -globin 遺伝子欠損マウスでも胎児肝での赤血球産生がなくなり、胎生中期に致死する。これらの欠損マウスが致死する原因は成体型ヘモグロビンの構成因子である  $\beta$ -globin と  $\alpha$ -globin とのタンパク量比の不均衡とそれに伴う成体型ヘモグロビン構造異常による成体成熟赤血球の減少であると考えられている。

一方エリスロポイエチンレセプター欠損マウスでは、成体型赤血球産生時の分化途中にある赤血球前駆細胞の生存と増殖に異常が起こるとされている。赤血球系前駆細胞の生存、増殖については現在解析中であるが、今回行った DNA マイクロアレイの結果において  $\alpha$ -globin の発現が S-II 遺伝子欠損マウスと野生型マウス間に差がみられないことから、S-II 遺伝子欠損マウスにおいて  $\alpha$ -globin と  $\beta$ -globin のタンパク量比が偏っているのではないかと予想した。そこで 13.5 日胚肝臓中に存在する各 globin タンパク質の存在比を電気泳動により解析した。その結果、 $\beta$ -globin タンパク量が  $\alpha$ -globin タンパク量に対して著しく減少していることを見出した (Fig 6)。また、胎児型 Y-globin 位置のバンドの発現増強が S-II 欠損マウスにおいて見出された。これは EKLF 遺伝子欠損マウスでみられる globin スwitching 異常と一致している。このことより、S-II 欠損マウスにおいて成体型成熟赤血球が減少する一因として globin の量比の異常があることが考えられる。

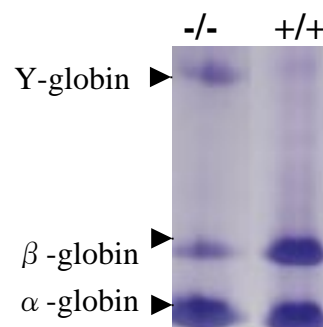


Fig 6. S-II 遺伝子欠損胎児肝における globin タンパク量比の異常。

### [まとめと考察]

本研究において私は、S-II 遺伝子欠損マウスは胎生致死であること、胎児期の赤血球形成の場である肝臓が異常となることを見いだした。また、EKLF、エリスロポイエチンレセプターなどの赤血球特異的遺伝子群が S-II 遺伝子の欠損により発現が減少していることを見いだした。さらに S-II 遺伝子欠損胎児マウスでは成体型成熟赤血球の数が減少することを見いだした。これらの結果から、S-II 遺伝子欠損によって発生中期の肝臓での赤血球産生に異常が起きていると考えられる。また今回 EKLF や  $\beta$ -globin の発現減少やそれに伴う成体型ヘモグロビン内の globin 量比の不均衡を見出したが、このような  $\beta$  サラセミア様症状がマウスでの致死性を導くことを考え合わせると EKLF や  $\beta$ -globin などの遺伝子の発現減少が S-II 欠損マウスが致死になる理由の一つだと考えている。

本研究は S-II という転写伸長因子が赤血球産生に関与することを示唆する初めての例である。成熟赤血球の減少を引き起こす原因として 1) 造血幹細胞自身の分化異常や生存、増殖異常と 2) 赤血球造血を支持する肝臓内微小環境の異常が起きたことが考えられる。どちらの要因が関わってくるかを知ることは今後の課題である。さらに赤血球産生過程において S-II に依存した転写伸長段階での遺伝子発現制御の分子機構を明らかにすることが重要であると考えている。