

氏名(本籍)	にし かわ けい ぞう 西川恵三(福井県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第3790号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	<b>Self-association of Gata1 enhances transcriptional activity in vivo in zebrafish embryo</b> ( <i>Gata1</i> 遺伝子の発現制御における <i>Gata1</i> の作用機序)
主査	筑波大学客員教授 理学博士 石井俊輔 (理化学研究所)
副査	筑波大学助教授 医学博士 小島寛
副査	筑波大学講師 医学博士 島野仁
副査	筑波大学講師 博士(理学) 梶和子

## 論文の内容の要旨

### (目的)

細胞分化に関わる分子的な基盤は、分化形質遺伝子の時期および細胞系列特異的な発現制御機構にある。血球細胞の分化形質遺伝子には数多くの転写因子が含まれる。中でも、本研究で注目した転写因子 *Gata1* は赤血球前駆細胞の分化・成熟過程において鍵となる役割を担っており、*Gata1* 遺伝子の発現を規定する制御機構が赤血球細胞への分化を誘導する1つの引金となる。*Gata1* 遺伝子の発現を制御するメカニズムには未だ不明な点が多いが、これまでに、様々な生物種の *Gata1* 遺伝子で共通に見られる制御配列として、GATA配列が明らかとなっている。このGATA配列へ作用する転写因子として、GATA因子が予想されるが、これまでに機能的な証拠は得られていない。近年、変異誘導剤 ENU を用いた変異体スクリーニングの結果、共同研究者らによってゼブラフィッシュの *Gata1* の完全機能欠失体が単離・同定された。この変異体の造血組織における *Gata1* 遺伝子の発現は、発生初期段階では観察されるのに対して、後期段階での発現量は著しく低下する。この結果から、*Gata1* 遺伝子を活性化する転写因子として、自身の翻訳産物の関与が示唆される。しかしながら、これまでの報告によれば、培養細胞に *Gata1* を過剰発現しても *Gata1* 遺伝子の発現は活性化されず、*Gata1* の自己制御機構の正否は結論されていない。本研究では、*Gata1* の自己制御を示唆する結果を得ているゼブラフィッシュの系を活用して、個体レベルでの *Gata1* の自己制御機構の是非及び作用機序の解析に取り組むことを目的とする。

### (対象と方法)

単離したゼブラフィッシュの *gata1* 遺伝子の翻訳開始点上流 8.1kb に発光蛋白質 GFP レポーター遺伝子を接続した構築(レポーター構築)を作製し、レポーター構築を安定に組み込んだトランスジェニックフィッシュ(Tg フィッシュ)の系統を樹立した。Tg フィッシュの初期胚へ *Gata1* RNA の微注入を行い、GFP 発

光を指標とすることで、生体内における Gata1 による *gata1* 遺伝子の制御の検討を行った。*gata1* 遺伝子の制御領域上の Gata1 の作用配列及び Gata1 の機能ドメインを、欠失及び点変異を導入したレポーター構築および Gata1 RNA を用いて解析した。同定された Gata1 の機能ドメインの意義を検討するために、結合因子との相互作用は、免疫沈降法による解析を行った。

#### (結果)

ゼブラフィッシュの *gata1* 遺伝子のレポーター構築を用いて、ゼブラフィッシュ初期胚における発現を解析したところ、内因性の *gata1* 遺伝子の発現を再現した GFP の発現誘導が観察された。この結果は、単離した制御領域が初期発生段階の造血組織における *gata1* の発現に十分であることを示す。Gata1 が自身の遺伝子の転写活性化に寄与するか否かを調べるために、Tg フィッシュの初期胚へ Gata1 RNA の注入実験を行った。Gata1 の過剰発現に伴い、異所性に GFP の発現誘導が観察された。この結果は、Gata1 が自身の遺伝子を正に制御していることを示している。さらに、欠失レポーター構築を用いた解析によって、この GFP 発現誘導は、制御領域上のダブル GATA 配列を介して生ずることも明らかとなった。

Gata1 遺伝子に対する Gata1 の作用機序を明らかにするために、Gata1 の機能ドメイン解析を行った。Gata1 の Zn フィンガードメイン (ZnF) の重要性を明らかにしていたので、まず最初に、N 末端側の ZnF へ結合する転写因子 FOG の関与を検討した。Gata1 の FOG 結合部位へ点変異を導入した変異 Gata1 を用いて解析を行った結果、過剰発現に伴う GFP 発現誘導に差は見受けられなかった。次に、Gata1 の ZnF ドメインに多数存在するアセチル化修飾部位の関与を検討した。脊椎動物種間で保存されている 6 ケ所のリジン残基に点変異を導入した変異 Gata1 (KA6) を用いて検討を行った結果、GFP の発現誘導が約 1/3 まで低下した。この結果は、Gata1 の自己制御には、Gata1 の ZnF に存在する 6 ケ所のリジン残基が重要であることを示している。KA6 のアセチル化修飾に対する影響を試験管アセチル化実験によって検討したが、予想に反して、KA6 は野生型 Gata1 と同等なアセチル化が観察された。一方、免疫沈降実験の結果、KA6 は Gata1 同士の相互作用が減弱することが明らかとなった。以上の結果は、Gata1 の自己制御において、Gata1 の self-association が重要であることを示唆している。また、DNA 結合解析の結果、Gata1 の self-association は、標的配列として同定されたダブル GATA 配列に高い親和性をもって形成されることも明らかとなった。

#### (考察)

これまで Gata1 の self-association は試験管内では示されてはいたが、その生理的役割及び作用機序は不明であった。今回の研究により、Gata1 の self-association は自身の遺伝子の発現に重要であり、その作用はダブル GATA 配列を介したものであることが明らかとなった。本研究で明らかにした Gata1 の self-association を伴う作用機序は、(1)  $\beta$  グロビン遺伝子などの制御モデルであるルーピング作用の一端を担う可能性、(2) 複数の GATA 配列を制御領域にもつ Gata1 標的遺伝子の一般的な制御様式の一角を担う可能性、を予想させる点でも興味深い。

#### (結論)

*Gata1* 遺伝子の自己制御の是非を検証するために、ゼブラフィッシュを用いて解析を行った結果、Gata1 は自身の遺伝子を正に活性化すること、及びこの作用は制御配列として同定された GATA 配列を介することが明らかとなった。続いて、自己制御における Gata1 の作用様式を解析した結果、Gata1 の self-association が重要であることを明らかにした。これまでに生化学的に Gata1 同士が相互作用するという報告はなされているが、生体内における役割に関してはまだ報告が無く、今回の発見は、*Gata1* 遺伝子の制御及び Gata1 の新たな作用機序を理解する上で重要な手がかりとなることが期待される。

## 審査の結果の要旨

西川恵三氏はトランスジェニックフィッシュ系統を用いて、転写因子 Gata1 が自身の遺伝子を正に活性化すること、及びこの作用には Gata1 の self-association が重要であることを明らかにした。この知見は Gata1 による転写及び発生の制御メカニズムを理解するために大変重要である。また、この研究成果が発端となり、他の転写因子でも self-association が重要な役割を果たすことが見つかる可能性がある。その意味では大変意義深い知見である。一連の実験に用いられた系は大変良く工夫されており、実験のデザインも良く考慮されている。実験は大変慎重に遂行されており、得られた結果の解釈も妥当である。結果の考察も大変慎重に為されており、注意深い議論が記載されている。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。