

氏 名（本籍）	おお 太 田 じゅん 潤
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 1 4 2 3 号
学位授与年月日	平 成 10 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）内科学系専攻
学位論文題目	転写調節因子マウス GATA-2 遺伝子の発現と制御

（主 査）

論文審査委員	教授 白 土 邦 男	教授 帯 刀 益 夫
	教授 佐 竹 正 延	

論文内容要旨

GATA-2 遺伝子は、造血系細胞の中でも特に未分化細胞に発現している。このような特徴的な制御様式を細胞・個体レベルで解析するために、リボ核酸 (RNA) にジゴキシゲニンで標識したアンチセンス RNA を相補結合させ、細胞内の GATA-2 RNA の発現をみる *in situ* ハイブリダイゼーション法と遺伝子発現制御領域機能を個体レベルで解析できるトランスジェニック法を中心に、発生学的な GATA-2 遺伝子の発現制御様式の検討を行った。

その結果、受精後 7 日目には、造血細胞の起源とされる側腹中胚葉に、9 日目には、動脈・生殖・中腎 (AGM) 領域に *in situ* 法で GATA-2 の mRNA の発現が認められた。その後、造血が盛んに行われる臓器は、胎児肝、脾臓、骨髄と、生体の成長とともに変遷するが、この時期と同じくして、GATA-2 を発現する細胞が生じては消えていく様子が観察された。このことは、GATA-2 が造血細胞に必須の遺伝子であることを示していると解釈される。さらに、GATA-2 の発現は、胎児期には、脊髄の前核、神経節でも認められ、生後は、大脳の皮質や大脳基底核の神経細胞にもその発現が認められた。すなわち、神経組織での GATA-2 の重要性も示唆された。

GATA-2 には第一エクソンが 2 つ存在しており、これらのプロモーターを通じて GATA-2 の発現が組織特異的あるいは生体の成長にあわせて制御されていると考えられた。このため、数種類の GATA-2 遺伝子の上流域にベータガラクトシダーゼ (LacZ) を繋げた遺伝子を作製し、これらを導入したトランスジェニックマウスを作製した。用いる上流域の長さの決定には DNA 活性化部位と相関が高いとされる DNA 分解酵素高感受性部位を考慮に入れた。*in situ* 法から得られた内因性 GATA-2 の発現と、導入遺伝子から得られる LacZ 染色の発現との比較から、下流のエクソン (IG エクソン) の上流領域は、胎児期の側腹中胚葉からの GATA-2 の転写活性化に、また、遠位のエクソン (IS エクソン) の上流域は AGM の形成期から、胎児肝、骨髄に至る造血系組織と、生後、大脳の神経細胞に必要とされていることが明らかとなった。骨髄細胞から得られた未分化造血細胞分画からの逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) の結果から、導入した遺伝子では IS エクソンと IG エクソンともに選択されており、この導入領域で内因性 GATA-2 に近い転写が行われていることが明らかとなった。

神経系では、造血系と異なる領域で転写活性化を認めたので、GATA-2 の転写活性化に臓器特異性を与える制御領域が存在することが明らかとなった。また、導入された遺伝子の領域の比較検討から、DNA 分解酵素高感受性部位が組織特異性を与えているエンハンサーに対応すると考えられた。

審査結果の要旨

GATA-2 遺伝子は造血幹細胞, 肥満細胞, 神経組織, 内皮細胞, 腎臓, 心臓等に発現が確認されており, 造血系細胞での解析が進んでいる。

本研究では GATA-2 の造血系, 内皮系, 神経系組織での発現, 特に, 胚発生初期からの発現様式を細胞と個体のレベルで検討し, それぞれの組織形成に対する GATA-2 の貢献と役割を解明すること, 2つの第一エクソンの組織特異的な制御の様子を, 内因性 GATA-2 遺伝子の発現とトランスジェニックマウスで転写される LacZ 遺伝子の発現とを比較することで, 遺伝子上の制御領域を同定し, 制御因子 GATA-2 の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。

in situ ハイブリダイゼーション法及びホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法を用い, 胎児各組織での GATA-2mRNA の発現を観察した。

LacZ 遺伝子を GATA-2 の IS エクソンの上流, それぞれ 6.0kb, 3.5kb, 2.5kb, 0.65kb から 1S エクソン上の Not I サイトまでの遺伝子断片を繋げ, また第二エクソンの ATG につらなる NcoI サイトを Mung Bean Nuclease で削った後 pSV β の Sma I site に繋げて導入遺伝子を作成した。導入遺伝子を受精卵の雄性核内にマイクロインジェクションし, トランスジェニックマウスを作成した。導入遺伝子は PCR を用いてその存在を確認した。トランスジェニックマウスより得られた骨髓細胞を FACS を用いて解析した。

GATA-2 は受精後 7 日目の胎児の原条に沿った腹側中胚葉に, 9 日目には動脈・生殖・中腎 (AGM) 領域と外胎盤に 12 日目以降は胎児肝, 脊髄, 脳, 神経節の細胞に発現が認められた。

DNA 分解酵素高感受性部位を含む 3.5 IS IG int LacZ を導入したトランスジェニックマウスの受精後 9 日目の胎児で導入した遺伝子がガラクトシダーゼを合成していることを示す青く染色される細胞が動脈・生殖・中腎 (AGM) 領域, 胎児肝などに見られた。成体のマウスでは骨髓細胞の一部大脳皮質, 基底核, 海馬の神経細胞, 小脳のプルキンエ細胞に見られた。DNA 分解酵素高感受性部位を含まない導入遺伝子をもつトランスジェニックマウスでは造血組織に陽性細胞は見られなかった。導入された LacZ 遺伝子が転写されているかどうかを PT-PCR を用いて確認した。

中胚葉から AGM, 胎児肝, 脾臓, 骨髓を通じて GATA-2 は常に造血組織, とくに未分化造血細胞で発現していた。DNA 分解酵素高感受性部位は造血系細胞の GATA-2 転写活性化に関与していると考えられた。神経系細胞では造血系細胞と異なる制御が行われていることが示唆された。

GATA-2 の造血系細胞, 神経系細胞での胎生期における発現と, GATA-2 の制御機構の解明は, 血液疾患の病態解明にも意義深いものと考えられ, 学位に値するものと考えられた。