

ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 変異ゼブラフィッシュを用いた血球運命メカニズムの探求

玉置 隼也 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 麻己人 (筑波大学 医学医療系)

[背景・目的]

単一の遺伝情報しか持たない多分化能細胞でも、エピジェネティクス制御により、異なる性質をもつさまざまな細胞に分化することができる。好例が造血幹細胞で、この細胞は全ての種類の血球細胞へと分化できるが、その理由は生涯を通じてエピジェネティクス制御が行われ続けるからである。私の研究室では、エピジェネティクス制御因子の一つである *lsd1* 遺伝子の突然変異ゼブラフィッシュを単離・系統化し、これを用いて LSD1 が血球運命決定に重要であることを発見した¹⁾。本研究の目的は、造血幹細胞におけるゼブラフィッシュ LSD1 の機能を明らかにすることである。

LSD1 は、ヒストン H3 の 4 番目のリジン (K4) を脱メチル化する酵素である。研究室の先輩である竹内らは、胚型造血において、*lsd1* 変異ゼブラフィッシュが赤血球及び骨髄球細胞の発生遅延を起こすことを見つけ、その原因が、*etv2* という遺伝子の発現亢進によると明らかにした¹⁾。*lsd1* 変異胚では、*etv2* 発現の亢進により、血球細胞になるべき細胞がヘマンジオブラストという血球-血管内皮共通前駆細胞で留まる。LSD1 はヒストン H3 の K4 を脱メチル化し、遺伝子発現の抑制を促すと考えられているが、竹内らは、ゼブラフィッシュ LSD1 が *etv2* 遺伝子プロモーター付近のヒストン H3K4 を脱メチル化することを実証した。さらに、血球分化における *etv2* 発現抑制の重要性を、*etv2* 遺伝子のノックダウンにより、赤血球及び骨髄球細胞の発生遅延が回復することを証明した。なお、私は、この結果を *lsd1:etv2* 二重変異胚を用いた解析で、遺伝学的にも実証することに成功している (図 1)。

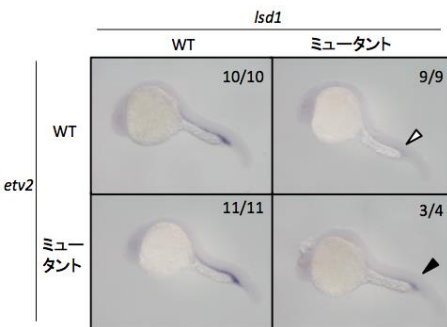


図 1 赤血球マーカー遺伝子を用いたホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション。*lsd1* 変異ゼブラフィッシュで減少する赤血球マーカー遺伝子の発現 (◀) が、*etv2* 遺伝子変異により回復する (▶◻)。

本研究で私が取り組んだのは胚型造血ではなく、成体型造血である。哺乳類などと同じように、ゼブラフィッシュにおいても、成体では全ての血球細胞は造血幹細胞から作られる。竹内らの準備的解析で、*lsd1* 変異ゼブラフィッシュが成体型造血においても異常をもつことが示唆されていたが、どの分化段階において、どのように異常が起こっているのかはほとんど調べられていなかった。そこで本研究では、まず、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法で、造血幹細胞や各種血球細胞特異的なマーカー遺伝子の発現を詳細に調べるとともに、造血幹細胞などの血球系列細胞が特異的に GFP 発光するトランスジェニックゼブ

ラフィッシュ系統を用いて、*lsd1* 変異体がどのような血球分化異常を示しているかを明らかにする。次に、この血球分化異常が LSD1 のどの作用点により生じるのかを明らかにするために、*etv2* を含む、LSD1 の標的候補遺伝子の遺伝子破壊系統の作製・解析を試みる、という戦略を立てた。これらの解析を通じて、造血幹細胞を中心とする成体型造血における LSD1 の生理機能の解明を行うことにした。

[実験材料・実験方法]

エンブリオの用意:

lsd1 ホモ変異体を得るためにヘテロ変異体の雌雄を交配させる。得られたエンブリオを必要な発生段階まで育てた後、必要に応じて 4% PFA で固定する。

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法:

各種マーカー遺伝子の発現を可視化するのに使われた。DIG でラベルされた RNA プローブを使用し、70°C で一晩ハイブリダイゼーションした。その後、抗 DIG 抗体の検出には BM purple を使用した。

遺伝子型決定:

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法などで解析されたエンブリオから DNA 抽出を行い、*lsd1* の変異が存在する部位を PCR により増幅したのち、野生型の DNA 断片のみを選択的に切断する制限酵素を用いて遺伝子型を決定した。

[結果・考察]

結果は卒業研究発表にて示す。

[展望]

今後は、2つの方向性を考えている。1つ目は、LSD1 本研究を継続して行い、目的である造血幹細胞におけるゼブラフィッシュ LSD1 の機能を明らかにすることである。特に、LSD1 作用点の探索を重点的に行っていききたい。2つ目は、DNA メチル化や他ヒストン修飾など、他のエピジェネティクスに関わる遺伝子がゼブラフィッシュの造血幹細胞でどのように機能しているのかを明らかにしていきたい。

[引用文献]

- 1) Takeuchi *et al.*, LSD1/KDM1A promotes hematopoietic commitment of hemangioblast through downregulation of Etv2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015