

発生過程に置いて血球幹細胞の分化・維持を制御する RNA ヘリカーゼ *Ddx46* の機能解明

広島大学大学院理学研究科生物科学専攻

博士課程後期 2 年 平林 諒

脊椎動物の造血は、発生初期に中胚葉細胞から直接血球細胞へ分化する Primitive Hematopoiesis (PH) と血管内皮細胞から血球幹細胞を介した造血が行われる Definitive Hematopoiesis (DH) の 2 つに大別される。DH で血管内皮細胞から分化した血球幹細胞は一時的な造血組織を経た後、最終的に成体の造血組織へと移動していく事が知られている。PH 過程に関しては多くの研究が為されているが、DH 過程に関しては未だ不明な点が多く残されている事から、DH 機構の解明には、変異体を用いた個体レベルでの解析が重要であると考えられた。

私達は、遺伝学的手法により消化器官の形成機構を解明するため変異体のスクリーニングを行った結果、消化器官・脳形成に異常を示すゼブラフィッシュ変異体 *morendo* (*mor*) の単離に成功した。解析の結果から *mor* 変異体の原因遺伝子は DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼ *Ddx46* である事が明らかとなった。*Ddx46* を含めた DEAD-box 型のタンパク質ファミリーは、遺伝子発現において mRNA の転写から核外への輸送まで多岐に機能している事が報告されており、私達は原因遺伝子として特定された *Ddx46* が pre-mRNA のスプライシングに機能することを明らかにした。

更に私達の研究室において *Ddx46* 変異体を詳細に解析した結果、変異体では PH 過程には異常が無く、DH 過程において血球幹細胞数が減少していることを見出した。*Ddx46* タンパク質は遺伝子の発現領域特異的に機能し、表現型を示す事が示唆されていたため、*Ddx46* の発現解析を行った結果、造血組織の 1 つである caudal hematopoietic tissue (CHT) に発現している事が明らかとなり、血球幹細胞マーカー遺伝子との共発現も認められた。過去の解析結果から頭部・消化器官において細胞死が起こる事が確認されていたため、血球幹細胞が多数存在している CHT における細胞死の検出を行った。しかしながら *Ddx46* 変異体の CHT において顕著な細胞死は確認されなかった。また、血球幹細胞の分化・増殖が正常に行われていない事を考慮し解析を行ったが、血球幹細胞の分化・増殖が既に起きているとされる受精後 48 時間では異常は確認されなかった。

顕著な細胞死が確認されず、また血球幹細胞の分化・増殖も初期においては正常であると支持される結果が得られた事から、血球幹細胞が他の血球細胞へと分化している可能性が示唆された。血球幹細胞からは大きく分けてリンパ球・赤血球・白血球の 3 系列の血球細胞へと分化し、それぞれの系列の中で更に分化していく事から、私達は分化し

た後の血球細胞に発現している遺伝子の発現解析を行った。その結果、赤血球・リンパ球系列のマーカ―遺伝子の発現が減少していたのに対して白血球系列のマーカ―遺伝子の発現は減少しない事が確認された。赤血球および白血球系列の血球細胞は同じ前駆体細胞から分化する事が分かっており、*Ddx46* 変異体では血球幹細胞が白血球系列の細胞へと分化している事が示唆されたため、赤血球誘導因子である *GATA binding protein 1a (gata1a)* と白血球誘導因子である *spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1 (spi1)* の2つの遺伝子に関して解析を行った。その結果、*gata1a* の発現が有意に減少し、*spi1* の発現は減少していない事が明らかとなった。また、*Ddx46* タンパク質は pre-mRNA のスプライシングに機能するため、*gata1a*、*spi1* の両遺伝子に関してスプライシングの解析を行った結果、発現が減少した *gata1a* のみスプライシングが異常になっている事が確認された。*gata1a* のスプライシングが異常であった事から、赤血球系列のマーカ―遺伝子の発現減少が、*gata1* のスプライシング異常によるものであるかを検討するため、*Ddx46* 変異体に対して Tol2 トランスポゾンシステムを用い、スプライシングが正常な *gata1a* の強制発現を行った。その結果、*gata1a* を強制発現させた *Ddx46* 変異体では、赤血球系列のマーカ―遺伝子の発現の回復が確認された。以上の結果から *Ddx46* はターゲットとなる遺伝子のスプライシングに機能する事で、血球幹細胞の多系列分化及び維持に機能している事が明らかとなった。

*Ddx46* 変異体において確認された造血異常に関して、遺伝子のスプライシング異常が原因である事が明らかとなったが、*Ddx46* タンパク質の直接・間接のターゲット遺伝子が不明であった。このため次世代シーケンサーを用いた解析を行い、野生型、*Ddx46* 変異体間で造血組織における遺伝子の発現解析を行った。その結果、発現の変化している遺伝子が新たに確認されたため、今後はそれら遺伝子のスプライシングが変異体において正常であるか、また造血に関してどのような機能を示すかの解析を行う事を検討している。