



Title	A newly identified gene Ahed plays essential roles in murine haematopoiesis
Author(s)	中井, りつこ
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101454
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	中井 りつこ
論文題名 Title	A newly identified gene <i>Ahed</i> plays essential roles in murine haematopoiesis (新しく同定した遺伝子 <i>Ahed</i> はマウス造血において必須の役割を果たす)
<p>論文内容の要旨</p> <p>〔目 的(Objective)〕</p> <p>哺乳動物の細胞は、核内に二倍体の遺伝子を有する。これまで急性骨髄性白血病との関連が示されてきた<i>Runx1</i>, <i>Gata2</i>, <i>Evi1</i>などの遺伝子は、片方のアレルの変異でも造血異常を発現する。しかし、多くの遺伝子異常はもう片方の正常アレルによって補完されてしまうため、造血に重要な機能を持つ潜性遺伝子の同定は困難であった。</p> <p>〔方法(Methods)〕</p> <p>我々はこの問題を克服するため、トランスポゾン の性質を持たせたgene trap vectorで片方のアレルに変異を導入し、相同染色体間組換えを抑制する Bloom syndrome 遺伝子を一過性に発現停止させることによって、通常の1000倍の頻度でホモ変異体が得られることを利用し、マウスホモ変異胚性幹細胞を作製した。この独自の変異胚性幹細胞を造血細胞に分化誘導する培養系で培養し、造血細胞への分化障害を来す潜性遺伝子の探索を行った。</p> <p>〔成績(Results)〕</p> <p>スクリーニングの結果、ある遺伝子の変異株において血球分化が著しく障害されていることを発見した。私たちはこの遺伝子をその特徴から“<i>Attenuated haematopoietic development (Ahed)</i>”と命名し、さらなる解析を行うことにした。<i>Ahed</i> 遺伝子は造血組織で特に高い発現を認めることから、造血系特異的な機能を解析するため、コンディショナルノックアウト (cK0)マウスを作製した。cK0 胚は胎生 16.5 日に顕著な貧血様の外観を呈し、胎生致死であった。成獣に対しても <i>Ahed</i> 欠損を誘導させると顕著な造血不全をきたし、誘導後1週間以内に全てのマウスが死亡した。以上より、<i>Ahed</i> はマウスの造血において、一生涯にわたり必須の役割を果たしていることがわかった。<i>Ahed</i> 遺伝子産物の細胞内局在を調べるため、N末端またはC末端に EGFP をタグ付けし共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、融合タンパク質は細胞質ではなく核に局在し、<i>Ahed</i> 遺伝子の産物が核蛋白であることがわかった。さらに、この蛋白のC末端側に非典型的な核局在シグナルが複数個存在することを見出した。このことから、<i>Ahed</i>蛋白の核局在に重要な部位が特定され、<i>Ahed</i>蛋白が核内の重要なイベントに機能を持っていることが推測された。<i>Ahed</i>蛋白の機能を明らかにするため、蛋白同士の会合を網羅的に調べたデータベースや、蛋白の構造から機能を推測するコンピューター解析の情報から、<i>Ahed</i> 蛋白は SF3A1 といった RNA スプライシングに関与する蛋白との強い相関が示唆されたため、RNAスプライシングに着目した解析を進めた。まず、選択的スプライシングにおける <i>Ahed</i> 蛋白の関与を明らかにするため、<i>Ahed</i> cK0 の造血幹・前駆細胞のハイスループットRNAシーケンスデータを用いて、サンプル間の差次的なイントロン使用量を定量化し解析したところ、造血において重要な役割を果たすことが知られている <i>Ythdf2</i>, <i>Se111</i>, <i>Zfp60</i>, <i>Pu.1</i> を含む 1369 個もの遺伝子の多様な転写物で、異常なスプライシングパターンが観察された。実際に造血幹・前駆細胞に対して従来の RT-PCR を施行し、これらの転写産物の長さを調べたところ、<i>Ahed</i> cK0 の造血幹・前駆細胞で、より大きなサイズの異常な転写物が存在することがわかった。さらに、これらの RT-PCR 産物の配列をサンガーシーケンスで実際に確認したところ、<i>Ahed</i> cK0 の造血幹・前駆細胞の転写物にイントロン配列が保持されていることを確認した。<i>Ahed</i> は、<i>cllorf57</i> というヒトのオルソログが存在することがわかっているため、悪性腫瘍に関連する遺伝子異常のデータベースを検索したところ、この <i>Ahed</i> 遺伝子の体細胞変異は、急性骨髄性白血病などの造血器腫瘍患者や、多くの固形腫瘍患者で繰り返し検出されていることも明らかになり、<i>Ahed</i> と病因との関連が強く示唆された。</p> <p>〔総 括(Conclusion)〕</p> <p>独自に作製したマウスの変異胚性幹細胞のプールから、造血に必須の働きをする未解析の遺伝子を同定し<i>Ahed</i>と命名した。<i>Ahed</i>は造血細胞に高発現し、マウスの胎児・成獣いずれの造血にも必須であることを明らかにした。<i>Ahed</i>は核内に局在する機能未知の蛋白質をコードしており、ヒトのオルソログは血液がんとの関連が示唆された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 中井 りつこ				
論文審査担当者	(職)		氏 名	
	主 査	大阪大学教授	保 仙 直 毅	審 査 長
	副 査	大阪大学教授	長 澤 丘 司	副 査
	副 査	大阪大学教授	井 上 大 地	副 査

論文審査の結果の要旨

造血の発生には多数の遺伝子が協調的に作用しており、その一部は血液がんの発症に関与している。しかし、多くの遺伝子の生物学的機能は未だ解明されておらず、機能未知の遺伝子を同定することは重要である。本研究では、独自に作製したマウスホモ変異胚性幹細胞ライブラリを用いて、潜性遺伝子のスクリーニングを行い、造血に必須の働きをする未解析の遺伝子を同定し、attenuated haematopoietic development (*Ahed*) と命名した。*Ahed*は造血細胞に高発現し、核内に局在する機能未知の蛋白質をコードしており、そのオルソログはヒトにも存在が確認された。分子遺伝学的な手法を駆使して解析を進めた結果、*Ahed*蛋白がRNAスプライシングの調節機構を介して造血に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに悪性腫瘍に関連する遺伝子異常のデータベースにおいて、*Ahed*遺伝子の変異がヒト急性骨髄性白血病において複数発見され、病因との関連が強く推測された。以上の成果は、博士（医学）の学位授与に値する。