

令和5年8月17日

各報道機関 御中

国立大学法人山梨大学

『赤血球分化における転写因子 *Klf17* と *Klf1* の重要性』を発見

山梨大学大学院総合研究部発生生物学の川原敦雄教授の研究グループは、脊椎動物間で保存されている転写因子 *klf17* 遺伝子および *klf1* 遺伝子をゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 法により破壊したゼブラフィッシュ変異体(*klf1-klf17* 二重変異体)を作製し、その変異体の機能解析を行った結果、両転写因子が協調して原始赤血球の分化を制御していることを明らかにしました(別紙参照)。

klf17 遺伝子は、ゼブラフィッシュから哺乳類まで分子構造が保存されている Klf 型転写因子 (Klf1~Klf17) の一つですが、ゲノム改変を基盤とした変異体の機能解析の報告がほとんどなく、*klf17* 遺伝子の器官形成における機能は十分には理解されていません。ゼブラフィッシュ *klf17* 遺伝子は、初期発生過程で血島(造血発生場)、孵化腺(孵化酵素を産生)、側線(水流を受容)に発現しています。私達は、これまでゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 法を用い *klf17* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュ (*klf17* 変異体) を作製し、その表現型解析を行いました。その結果、*klf17* 変異体では孵化腺細胞が生成されないこと、さらに、側線の発生過程において感丘が減少することを見出しましたが、脊椎動物間での共通性が想定される造血発生における機能は未解明のままです。造血発生場である血島は、*klf17* 遺伝子以外に *klf1* 遺伝子を含む Klf 型転写因子が複数発現していますので、*klf17* 変異体では他の Klf 型転写因子が機能的に補完することで造血発生異常が認められないことが考えられました。本研究では *klf17* 変異体に加え、*klf1* 変異体と *klf1-klf17* 二重変異体を新たに作製し、造血発生における Klf 型転写因子の生理機能を調べました。

klf1-klf17 二重変異体では、*klf1* 変異体、*klf17* 変異体および野生型と比較して循環する原始赤血球の数が減少することを見出しました(別紙参照)。*klf1-klf17* 二重変異体の赤血球におけるヘモグロビン産生は減少していること、さらに、赤血球分化マーカー遺伝子の遺伝子発現が抑制されていることを明らかにしました。これらの研究結果から、Klf17 転写因子が Klf1 転写因子と協調して赤血球の分化を制御していると考えられました。ヒト *KLF1* 遺伝子は、先天性赤血球形成異常性貧血の原因遺伝子の一つであると考えられていますので、ヒト *KLF17* 遺伝子も未同定の上記疾患の原因遺伝子の候補と考えられます。今後、ヒト *KLF17* 遺伝子の造血発生における機能を解明することが重要だと考えられます。

なお、この研究発表は、2023年8月10日(木)午後6時(日本時間)に、Scientific Reports(電子版)の Online Publication として掲載されました。

論文タイトル: Cooperative contributions of the *klf1* and *klf17* genes in zebrafish primitive erythropoiesis
(ゼブラフィッシュ *klf1* 遺伝子と *klf17* 遺伝子による協調的な原始赤血球の造血発生)

山梨大学大学院総合研究部（発生生物学）の川原敦雄教授は、脊椎動物間で保存されている転写因子 *klf17* 遺伝子および *klf1* 遺伝子をゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 法より破壊したゼブラフィッシュ変異体 (*klf1-klf17* 二重変異体) を作製しその表現型解析を行った結果、*klf1-klf17* 二重変異体では原始赤血球の数が減少すること、形態学的に分化不全が観察されること、および、赤血球の分化マーカー遺伝子の発現が抑制されていることを見出しました。これらの結果は、Klf17 転写因子が Klf1 転写因子と協調して原始赤血球の発生・分化に重要な役割を担っていることを示しています。この研究成果は、2023 年 8 月 10 日 (木) 午後 6 時の *Scientific Reports* (電子版, Springer Nature Group) の Online Publication として掲載されました。

<https://www.nature.com/srep/>

1. 内容 (概略)

論文タイトル: Cooperative contributions of the *klf1* and *klf17* genes in zebrafish primitive erythropoiesis

(ゼブラフィッシュ *klf1* 遺伝子と *klf17* 遺伝子による協調的な原始赤血球の造血発生)

Klf 型転写因子 (Klf1~Klf17) は C 末端にジンクフィンガー型 DNA 結合ドメインを持つ転写因子です。例えば Klf4 転写因子は iPS 細胞の作製に必要な 4 転写因子の一つであり分化した細胞の初期化に重要だと考えられていますが、各 Klf 型転写因子の器官形成における生理機能は十分には解明されていません。私達は、これまでに *biklf* (*blood island-enriched kruppel-like factor*)/*klf17* 遺伝子が、初期発生過程で血島 (造血発生の場)、孵化腺 (孵化酵素を産生) および側線 (水流を受容) に特異的に発現する新規の Klf 型転写因子として報告しました (Kawahara A. et al., *Current Biology* 2000)。その後、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 法により *klf17* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュ (*klf17* 変異体) を作製しその表現型解析を行った結果、*klf17* 変異体では孵化腺細胞が生成されないこと、さらに、側線の発生過程において感丘が減少することを見出しました (Suzuki H. et al., *Scientific Reports* 2019)。しかしながら、脊椎動物間での共通性が想定される造血発生における *klf17* 遺伝子の機能は未解明のままです。造血発生の場である血島には *klf17* 遺伝子以外に *klf1* 遺伝子を含む複数の Klf 型転写因子の発現が報告されていますので、それらが機能的に補完している可能性があります。本研究では *klf17* 変異体に加え、*klf1* 変異体と *klf1-klf17* 二重変異体を新たに作製し、造血発生における Klf 型転写因子の生理機能を調べました。

klf1 変異体および *klf17* 変異体は野生型と同じように正常な造血発生が観察されますが、*klf1-klf17* 二重変異体では循環する原始赤血球の数が減少することを見出しました (図 1)。原始赤血球は分化が進むと核がコンパクトになりますが、*klf1-klf17* 二重変異体では核-細胞質の比が大きい状態で維持され、赤血球が分化異常を示していることが分かりました。赤血球の酸素の運搬にはヘモグロビンが重要な機能分子として働きますが、ヘモグロビンの産生量を o-dianisidine 染色で計測すると、*klf1-klf17* 変異体でヘモグロビン産生が低下していることが分かりました (図 2)。さらに、赤血球での遺伝子発現を調べた結果、造血幹細胞マーカーである *scl* 遺伝子や *c-myc* 遺伝子の発現に差はありませんが、赤血球分化マーカー遺伝子 (*alas2*, *band3*, *mitoferrin*) の発現が特異的に低下していました (図 3)。これらの研究結果から、Klf17 転写因子が Klf1 転写因子と協調して原始赤血球の分化を制御していることが明らかとなりました。

2. 今後の研究について

本研究では、*klf1-klf17* 二重変異体の機能解析から Klf17 転写因子が Klf1 転写因子と協調して赤血球分化を制御していることを明らかにしました。*klf1-klf17* 変異体では赤血球分化マーカー遺伝子である *alas2*, *band3*, *mitoferrin* 遺伝子の発現が特異的に抑制されていたので、これらの遺伝子の発現調節を両転写因子が直接行っている可能性があります。今後は Klf 型転写因子群による造血発生の詳細な制御機構の解明が重要な研究課題だと考えられます。本研究では Klf1-Klf17 分子の初期造血発生における生理機能を明らかにしましたが、両転写因子の生育過程あるいは成体における生理機能は十分には理解されていないので、今後の重要な研究課題だと考えています。

3. 今回の研究の医学分野への応用に関して

赤血球の生成過程はゼブラフィッシュと哺乳類で非常によく保存されていることが知られていますので、ヒト *KLF17* 遺伝子が原始赤血球の発生・分化を制御している可能性があります。最近、赤血球の数が減少する病気である貧血において様々な遺伝子におけるゲノム変異が見つかってきています。興味深いことに、ヒト *KLF1* 遺伝子は先天性赤血球形成異常性貧血の原因遺伝子の一つであると考えられていますので、私達の研究成果はヒト *KLF17* 遺伝子も未同定の上記疾患の原因遺伝子の候補になりうることを示唆しています。今後、未解明のヒト遺伝性貧血の原因遺伝子としてヒト *KLF17* 遺伝子にゲノム変異があるか否かを解析することが重要であると考えています。

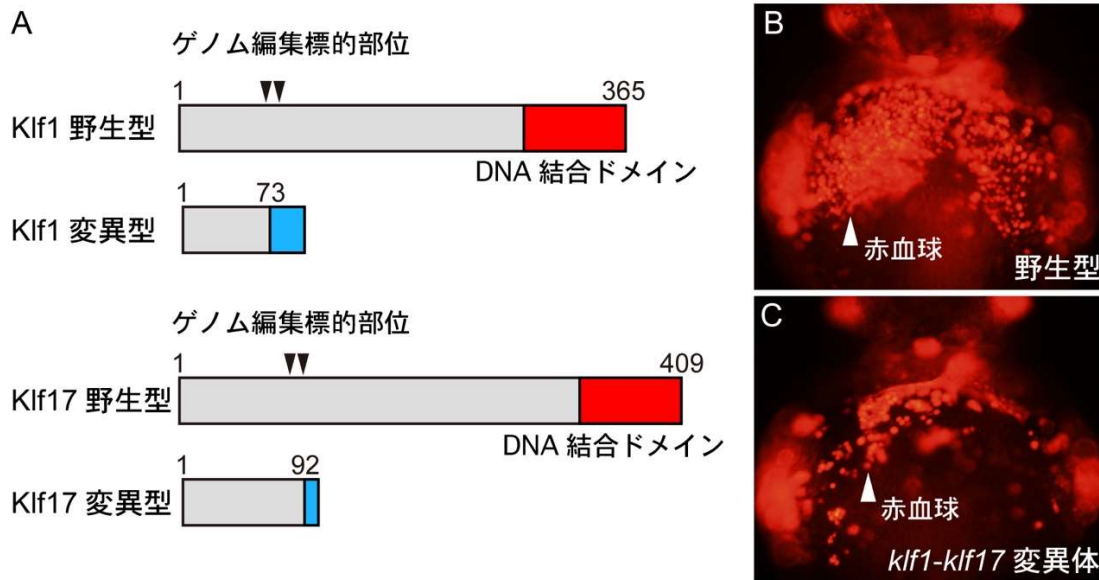


図 1 Klf1 変異型および Klf17 変異型の分子構造と *klf1-klf17* 二重変異体における赤血球の減少
 (A) Klf1 野生型、Klf1 変異型、Klf17 野生型と Klf17 変異型の分子構造を示した。赤は DNA 結合ドメインであるジンクフィンガー・ドメインを示す。青はミスセンス・アミノ酸を示す。数字はアミノ酸の数を示す。Klf1 変異型と Klf17 変異型は DNA 結合ドメインを欠失しており、機能欠損型タンパク質を発現していると考えられた。(B, C) 循環する赤血球を Tg(*gata1:mRFP*) (赤血球特異的に赤色蛍光タンパク質を発現している系統) で可視化した。*klf1-klf17* 二重変異体は野生型と比較して卵黄囊の上を循環している赤血球の数が減少している (1 日胚)。

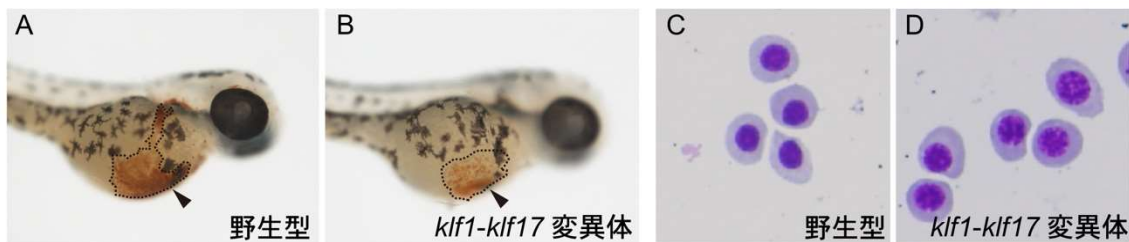


図 2 *klf1-klf17* 二重変異体におけるヘモグロビン産生量と赤血球の形態 (2 日胚)
 (A, B) ヘモグロビン産生量を *o*-dianisidine 染色で可視化 (茶色) している。*klf1-klf17* 二重変異体でヘモグロビン産生量が減少している。(C, D) 赤血球の Wright-Giemsa 染色 野生型では核-細胞質の比が小さくなるが、*klf1-klf17* 二重変異体では大きい状態で維持されており、赤血球の分化に異常を示している。

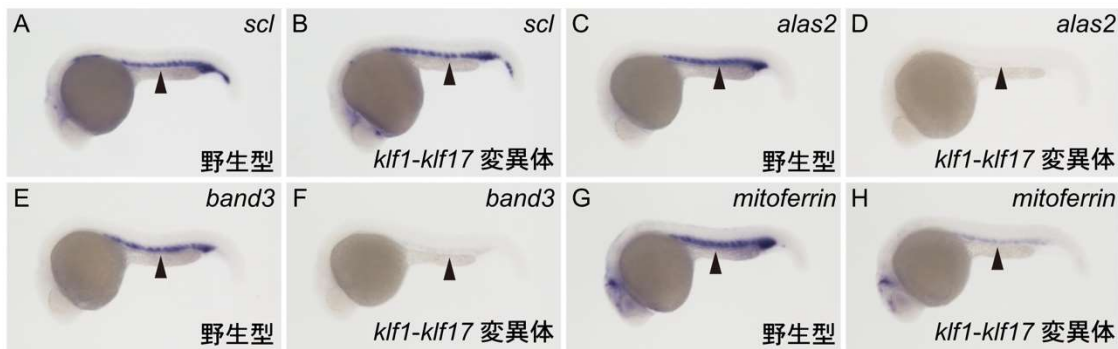


図3 *klf1-klf17* 二重変異体における赤血球分化マーカー遺伝子の発現異常 (1日胚)

(A, B) *scl* : 造血幹細胞マーカー遺伝子, (C, D) *alas2* : ヘム合成酵素, (C, D) *band3* : 赤血球特異的輸送体, (C, D) *mitoferrin* : 鉄代謝制御分子

造血幹細胞マーカーである *scl* 遺伝子の発現は野生型と *klf1-klf17* 二重変異体で差がないが、赤血球分化マーカーである *alas2*, *band3*, *mitoferrin* 遺伝子の発現は *klf1-klf17* 二重変異体で特異的に抑制されていた。

[用語説明]

CRISPR-Cas9法 : ゲノム編集技術の一つで標的ゲノム部位にDNA二重鎖切断を誘導できる。その後に引き起こるゲノム修復の過程において高頻度で挿入・欠失変異が導入されることで効率よく標的遺伝子が破壊される。

Klf型転写因子 : C末端にショウジョウバエのKrüppelに相同性のあるジンクフィンガー型DNA結合ドメインを持つ転写因子群である。ショウジョウバエKrüppelは、転写制御を介して形態形成を調節することが知られている。

[論文に関する情報]

Cooperative contributions of the *klf1* and *klf17* genes in zebrafish primitive erythropoiesis
Hiroaki Suzuki, Tomotaka Ogawa, Shigeyoshi Fujita, Ryota Sone, Atsuo Kawahara
Scientific Report, in press, 2023

<https://www.nature.com/srep/>

医学部生 : 鈴木啓章、小川智誉、藤田成美

学部の学生がこの研究の中で重要な役割を担ったことも本研究の特色です。

(お問い合わせ先)

国立大学法人 山梨大学大学院総合研究部 総合医科学センター 発生生物

教授 川原 敦雄 (かわはら あつお)

TEL : 055-273-9375

e-mail : akawahara@yamanashi.ac.jp

(広報担当)

国立大学法人 山梨大学 総務企画部

総務課広報企画室

TEL : 055-220-8005

e-mail : koho@yamanashi.ac.jp