

# GATA 因子スイッチングと GATA-1 関連白血病

清水 律子<sup>1</sup>, 山本 雅之<sup>2</sup>

近年の転写因子研究の進歩から、培養細胞系への一過性の遺伝子導入実験や単純なノックアウトマウスの表現型解析からは、転写因子が果たしている機能貢献の全貌を理解することは困難であることが示されている。GATA-1 と GATA-2 は造血系細胞の増殖と分化制御に重要な転写因子であり、多系列の遺伝子変異マウスの個体解析を通して、それら自身の遺伝子発現が緻密かつ多層的に行われていること、そして、その破綻が白血病などの病態の発症基盤を形成することが明らかになっている。

## はじめに

血液は、赤血球・白血球・血小板などの血球成分とタンパク質・脂質・糖質・電解質を含む血漿成分から成り、いずれの成分も血流によって体の隅々にまで運搬されることによって、本来の機能を発揮する。血液細胞は生体細胞の中では比較的寿命の短い細胞なので、生体の恒常性維持には、成熟した血液細胞を過不足なく産生するメカニズムが必須である。脊椎動物では、血液細胞に二つの起源が同定されている。胎児型血液細胞は臓側中胚葉より発生する卵黄嚢で作られるが、一方、成体型血液細胞は胎生中期に背側大動脈周辺のパラアオリック（para-aortic splanchnopleura）組織や大動脈・生殖器・腎臓を形成する AGM（aorta-gonad-mesonephros）領域で発生し、胎児肝臓、最終的には骨髄に造血の場を移行する。なお、マウスでは脾臓も重要な成人造血の場である。造血幹細胞や前駆細胞から、それぞれの系列の血球が正しく成熟するためには、系列特異的な

転写因子群により、造血系遺伝子の発現が緻密かつ階層的に制御されることが大切である。GATA 転写因子群は、このような役割を担っている系列特異的な転写因子のプロトタイプであり、互いにネットワークを形成しながら標的遺伝子群と自らの発現を調節している<sup>1,2)</sup>。一方、GATA 因子の機能失調は生体恒常性の破綻と細胞のがん化を引き起こす<sup>3)</sup>。最近、GATA-1 遺伝子の特異的な変異がダウン症候群に随伴する急性巨核芽球性白血病（acute megakaryoblastic leukemia）と類白血病反応（transient myeloproliferative disorder）の発症に深く関与していることが明らかにされた<sup>4)</sup>。私たちは、GATA 因子の失調に起因する白血病を総称して、「GATA 関連白血病」と呼んでいる。

哺乳動物では、GATA 転写因子群は GATA-1 から GATA-6 までの 6 因子から構成されている。このうち、GATA-1 から GATA-3 はおもに血液細胞に発現するのに対して、GATA-4 から GATA-6 はおもに心臓や消化器系の実質臓器に発現している。このことから、前者を血球型 GATA 因子、後者を内臓型 GATA 因子と呼んでいる。それぞれの GATA 因子の発現や機能の解析は、系列特異的な鍵転写因子の研究として精力的に実施されているが、これらに関する先端的な成果を話し合う目的で、国際 GATA 因子会議が 3 年に 1 回のペースですでに 4 回開催されている。ちなみに、第 2 回はつくばで開催された。また、第 5 回は 2010 年に仙台で開催される予定である。

GATA-1 と GATA-2 は造血系発達に必要な因子であることが、遺伝子破壊マウスを用いた解析によりすでに明らかにされている。また、*Gata1* 遺伝子と *Gata2* 遺伝子の発現は、発達時期や細胞系列に特異的な巧妙なネットワークに

<sup>1</sup> 筑波大学先端学際領域研究センター（〒305-8577 つくば市天王台 1-1-1）

<sup>2</sup> 東北大学大学院医学系研究科医化学分野（〒980-8575 仙台市青葉区星陵町 2-1）

Function and gene expression regulation of GATA-1 and GATA-2 transcription

<sup>1</sup>Ritsuko Shimizu (Center for TARA and Institute for Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba 305-8577, Japan)

<sup>2</sup>Masayuki Yamamoto (Department of Medical Biochemistry, Tohoku University School of Medicine, 2-1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai-shi 980-8575, Japan)

より制御されている。さらに、これらの GATA 因子の機能ドメインもたいへん精密に構築されている。これらの仕組みにより、血液細胞の分化方向性の決定や増殖が巧妙に調節されていることが明らかとされつつある。本稿では、GATA-1 と GATA-2 に焦点を当て、血液細胞の分化、増殖、そして、恒常性維持に際して、これらの GATA 因子が果たす機能貢献、そして、それを支える分子基盤について、最近の成果を紹介したい。

### 1. 多層的な *Gata2* 遺伝子の発現制御

マウスの GATA 因子遺伝子の多くは、二つの非翻訳領域をコードする第 1 エキソンを含んでいる。一方、翻訳される領域は共通して五つのエキソン（第 2 から第 6 エキソン）にコードされている。二つの第 1 エキソンはいずれも、組織・細胞系列特異的な GATA 因子遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしている様子である。例えば、マウス *Gata1* 遺伝子には、遠位に位置する IT エキソンと近位に位置する IE エキソンがあり、前者は精巣セルトリ細胞特異的に、後者は血液細胞特異的に利用されている<sup>5)</sup>。一方、*Gata3* 遺伝子の二つの第 1 エキソンは、T 細胞分化の過程で巧妙に使い分けられている<sup>6)</sup>。

*Gata2* 遺伝子にも、ヒトとマウスでよく保存された二つの第 1 エキソンが存在し、組織・細胞系列特異的な *Gata2* 遺伝子の発現制御を司っている<sup>7)</sup>。*Gata2* 遺伝子の近位第 1 エキソン (IG エキソン) は、造血組織だけでなく神経系細胞や血管内皮細胞、泌尿生殖器や肝臓、心筋など、幅広い組織での GATA-2 発現を指令している。一方、遠位第 1 エキソン (IS エキソン) は、造血幹細胞や前駆細胞と神経組織に特異的な *Gata2* 遺伝子の発現に寄与している<sup>8)</sup>。当研究室の鈴木らは、緑色蛍光物質 (GFP) 遺伝子を IS エキソンにノックインしたマウスを作製し、この特異的な発現プロファイルを利用して、そのマウスの骨髄における GFP 陽性細胞の超微速度動画解析から、GATA-2 を発現する造血幹細胞が、骨芽細胞が構成する骨髄ニッチの中で、単独でかつ静かに存在していることを実証した (図 1)<sup>9)</sup>。

遺伝子破壊マウスや特殊な培養細胞実験系を用いて得られた解析結果から、GATA-2 は成体型造血、特に、幹細胞や多能性前駆細胞の維持・増殖に不可欠である<sup>10-13)</sup>。そこで、そのような細胞系列における *Gata2* 遺伝子の発現制御様式を理解する目的で、トランスジェニックレポーターマウス系を用いた解析が実施されている。その結果、IS エキソンとその上流 7kb 領域があれば、胎生中期の造血・神経組織に GATA-2 を発現させることができることが明らかになった<sup>14)</sup>。一方、酵母人工染色体 (YAC) を用いた解析から、成人型造血までを正常に行わせるためには *Gata2* 遺伝子座を含む 250kb の領域が必要であること、そ

の領域内の広く散在する複数のエンハンサーが GATA-2 の発現と造血発生を支えるために必須であることも明らかにされている<sup>15-18)</sup>。

*Gata2* 遺伝子の造血組織以外での発現には、造血組織に対するものとは異なるエンハンサー (シス制御領域) が利用されている (図 2A)。YAC や大腸菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome; BAC) を用いたこれらのエンハンサーの見事な解析が、最近、Engel 博士の研究室から報告されている。例えば、心臓内膜や血管内皮細胞における *Gata2* 遺伝子の発現には第 4 イントロンに存在するエンハンサーが重要であり、特に、その中の Ets 転写因子結合配列が鍵となっている。また、脊髄の V2 介在ニューロンにおける *Gata2* 遺伝子の発現には、第 5 イントロンに存在する約 190bp 領域が必要十分である<sup>19,20)</sup>。さらに、泌尿器系組織の発達、特に、尿管・膀胱接合部の形成には、*Gata2* 遺伝子座の下流に存在する二つのエンハンサーが重要である。これらの解析を通して理解されることは、*Gata2* 遺伝子の制御に当たるエンハンサーはこの locus (遺伝子座) に幅広く分布していることであり、周辺の 1Mb 以上の領域をもってしても、*Gata2* 遺伝子の完全な発現には十分ではない<sup>21)</sup>。興味深いことには、*Gata2* 遺伝子座下流の泌尿器系組織特異的な発現制御領域と前述の *Gata2* 遺伝子座上流に存在する造血組織特異的な発現制御領域は、それぞれ *Gata2* 遺伝子座に隣接する全く別の遺伝子のイントロン領域に位置している。すなわち、私たちの予想を超えて、*Gata2* 遺伝子のような精密かつ多層性の制御を必要とする遺伝子の発現は、染色体上に直列に位置するそれぞれの遺伝子の“なわばり”を超越した範囲に分布する複数のシス領域により多層的に制御されている。

### 2. *Gata1* 遺伝子のネットワーク発現制御機構

*Gata2* 遺伝子と異なり、*Gata1* 遺伝子の制御領域のほとんどは、第 2 エキソンにある *Gata1* 翻訳開始点から約 15 kb 領域に集約されている<sup>22)</sup>。この領域は、二つの第 1 エキソンと一つの第 1 イントロンを含む。上述のように、IE エキソンは血液細胞特異的な GATA-1 発現に貢献し、IT エキソンは精巣セルトリ細胞での GATA-1 発現に寄与している<sup>5,23)</sup>。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ (LacZ) をレポーターとしたトランスジェニックマウス解析 (「ブルーマウス解析」とも呼ぶ) において、この約 15kb の領域は造血組織とセルトリ細胞の両方での GATA-1 発現を概ね再現できる。この領域には、これら二つの組織での GATA-1 発現を巧妙に調節する二つの組織特異的なエンハンサーが隣り合って存在している。これら二つのエンハンサーは、それぞれ血球系細胞での GATA-1 発現を調節する *Gata1* hematopoietic enhancer (G1HE) と精巣での GATA-1 発現を調節する *Gata1* testis activation region (G1TAR) と呼ばれて

いる。ここでの重要な発見は、G1HEはIEエキソンに、また、G1TARはITエキソンにそれぞれ働きかけ、組織・細胞系列特異的な*Gata1*遺伝子の発現調節に関与していることである<sup>22,24</sup>。すなわち、隣り合わせに存在する二つのエンハンサーは、プロモーターを特異的に選択して機能している。

遺伝子発現の制御領域解析に前述のトランスジェニックレポーターマウス解析法はたいへん強力な手法となる。実際に、本解析法をさらに広範に実施した結果、血液細胞でのGATA-1発現にはG1HEとIEエキソンを含む約8kb領域で実質的に十分であることが明らかになり、この領域はG1-HRD (*Gata1* gene hematopoietic regulatory domain)と呼ばれている。G1-HRDはトランスジェニックマウス系で、造血系に特異性高く遺伝子を発現できる使いやすいサイズの制御領域であり、後述するトランスジェニック相補レスキュー実験系でも活用されている。

さて、G1-HRD中で血液系エンハンサーとして機能しているのは前述のG1HEであるが、G1HEは当初約1.3kb領域として同定された<sup>22</sup>。その後の解析から、G1HE中にはコア領域(約150bp)が存在し、本領域はG1-HRDやG1HEに対して中核的な機能貢献を果たしていることが明らかになっている。本コア領域には1個のGATAボックスと2個のEボックスが存在している。GATAボックスは胎児型と成体型のいずれの造血においてもG1HEの機能発現に必須であるが、一方、2個のEボックスは両方ともG1HEの機能には必須ではない<sup>25</sup>。

プロモーター近傍領域に目を向けると、IEエキソンの直上域にGATAボックスがタンデムに並んで存在するdouble GATA領域とそのdouble GATAモチーフに隣接してCP2結合配列が存在し、CP2因子がGATA因子と協調的に遺伝子発現を調節していることが示されている<sup>26</sup>。また、その近傍にはCACCCモチーフを含む領域が存在する。さらに、成体型造血でのGATA-1発現には、第1エキソン内に存在する特徴的なGATAリピートを内包するintron SP領域(約320bp)も必要である<sup>27</sup>。

これら四つのGATA-1調節領域、すなわち、G1HEコア領域、double GATAとCP2結合配列領域、CACCC領域、intron SP領域(図2B)をタンデムに連結した約1kbの人工*Gata1*ミニジーン(図2B)を調製し、トランスジェニックレポーター解析法でその発現を検討したところ、四つのシス領域の一つでもかけると、*Gata1*遺伝子の発現は再現できなかった<sup>27</sup>。このことは、血液細胞での時空間的特異的な*Gata1*遺伝子発現を制御するためには、GATA因子を含む複数の転写因子による協調的な転写制御が必要であること、このような精巧な発現調節メカニズムが血球分化を巧みに調節する重要な機能を担っていることを示している。

### 3. GATAスイッチング：血球分化に際してのGATA因子の使い分け

これまでの培養細胞株を用いた解析から、特定の転写因子を骨髄前駆細胞に過剰発現させることにより、当該血液細胞の分化方向性を変化させ、異なった系列への分化に導くことが可能なケースがあることが報告されている。例えば、未分化骨髄細胞にGATA-1を強制発現させると、同細胞は巨核球系列へと分化する<sup>28,29</sup>。骨髄芽球にレトロウイルスを用いて様々な量のGATA-1を発現させると、発現量の多寡により、好酸球、赤血球、巨核球系列のいずれかへと分化する<sup>30</sup>。また、赤血球系前駆細胞にGATA-2を強制過剰発現させると、同細胞の分化抑制と増殖亢進が惹起される<sup>31,32</sup>。一方、遺伝子破壊マウスの解析から、GATA-1は赤血球・巨核球系細胞の分化<sup>33-35</sup>、好酸球分化<sup>36,37</sup>・マスト細胞の後期分化<sup>38</sup>に重要であること、また、GATA-2は特に成体型造血において未分化前駆細胞の増殖に必須であることがわかっている<sup>39</sup>。このような機能喪失や機能獲得型の解析は、造血発生の適切な調節のためにGATA-1とGATA-2の両者が必須であることを明解に示している。しかし、このような培養細胞解析系や単純なノックアウトマウス解析のみでは、それぞれの転写因子の果たす機能貢献の全容を明らかにするのは容易ではない。鍵転写因子がどのような発現プロファイルで、どのような標的遺伝子を、どのように調節しているか、を理解するためには、さらに進んだ解析系を組み立てる必要がある。

トランスジェニックレポーターマウス解析から、胎生初期の造血組織において、血球系へのポテンシャルを持った未分化な細胞でのGATA-2発現のレベルは高いことが示されている。それは、分化開始とともに一過性に減少するが、血球前駆細胞の性質を獲得するにつれて再び増強する<sup>40</sup>。このような複雑なGATA-2の発現プロファイルは、造血発生の初期段階で、無秩序な分化開始による前駆細胞の枯渇を防ぎ、未分化な細胞が適切な数だけ残存するように、GATA-2がゲートキーパーの作用を果たしていることを示唆する。一方、成体骨髄では、GATA-2は造血幹細胞や多能性幹細胞で発現しており、赤血球系列に分化していくにつれ徐々に減少するが、対照的にGATA-1発現は分化に伴って徐々に増加していく(図3)<sup>41</sup>。筆者らは、このようなGATA因子間のネットワーク発現制御を「GATAスイッチング」と呼んでいる。興味深いことに、この時系列にそったGATA-2からGATA-1への発現スイッチはGATA-1とGATA-2自身により制御されている様子である。すなわち、未分化細胞では、GATA-2が*Gata2*遺伝子ISプロモーター近傍に存在する複数のGATA結合配列に結合してGATA-2自身の発現を正に自己制御している(図2A)。分化が進むにつれて、GATA-2により*Gata1*遺伝子

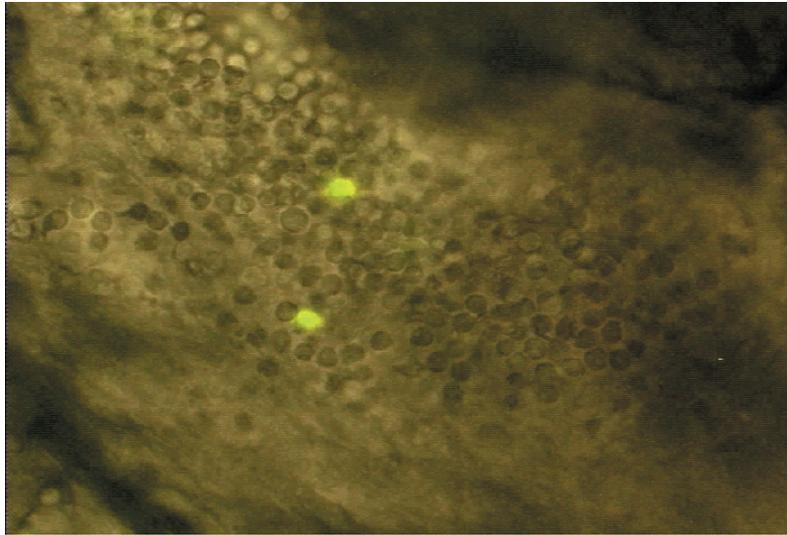


図1 骨髄ニッチのなかに孤立して存在している GATA-2 を発現している骨髄幹細胞

*Gata2* 遺伝子の血液細胞特異的な第1エクソンに緑色蛍光物質を発現する *GFP* 遺伝子をノックインしたマウスに抗がん剤 5-フルオロウラシルを注射した。48時間後のマウス骨髄。GFPを発現する細胞は、骨髄中に孤立して存在している。蛍光顕微鏡による微速度撮影により、GFPを発現していない細胞は非常に活発に動いているが、GFPを発現する造血幹細胞はほとんど動かないことが示された。(文献9より引用)

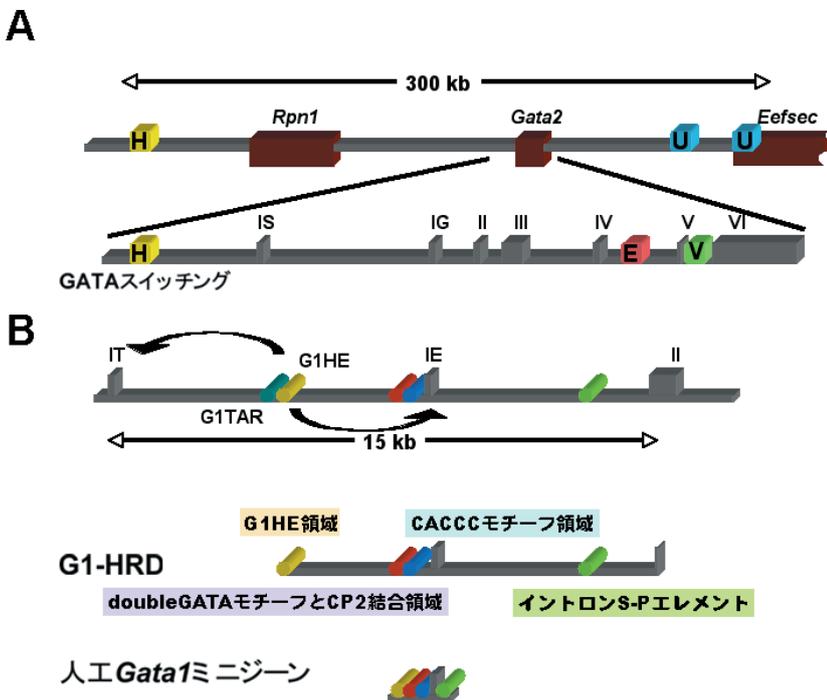
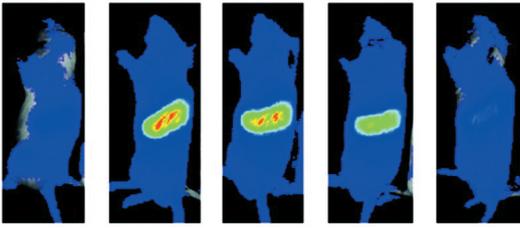


図2 *Gata2* 遺伝子と *Gata1* 遺伝子の制御領域

(A) 広範な領域に分布する *Gata2* 遺伝子の組織特異的なシス制御領域。造血組織特異的エンハンサー(H)や泌尿器系組織特異的エンハンサー(U)は *Gata2* 遺伝子座に隣接する別の遺伝子のイントロン領域に存在する(上段)。一方、内皮細胞特異的エンハンサー(E)や脊髄のV2介在ニューロン特異的エンハンサー(V)は *Gata2* 遺伝子のそれぞれ第4, 第5イントロンに存在する。また、GATAスイッチングにかかわるGATA結合配列(H)は、ISエクソン上流3kb付近に存在している(下段)。しかし、これらの領域を用いても、*Gata2* 遺伝子の完全な発現には十分ではない。

(B) *Gata1* 遺伝子の制御領域。血球系細胞でのGATA-1発現を調節する領域(G1HE)と精巣でのGATA-1の発現を調節する領域(G1TAR)は互いに隣接して存在し、それぞれ血球特異的第1エクソン(IE)と精巣特異的第1エクソン(IT)を選択して機能している(上段)。G1HEとIEエクソンを含む領域(G1-HRD)には、血球でのGATA-1の発現に重要な四つのシス領域が存在する(中段)。この四つのシス領域を直列に連結した約1kbの人工Gata1ミニジーンを用いれば、血球系細胞での時空間的なGATA-1の発現を再現できる(下段)。

### Gata1遺伝子の発現



### グロビン遺伝子の発現

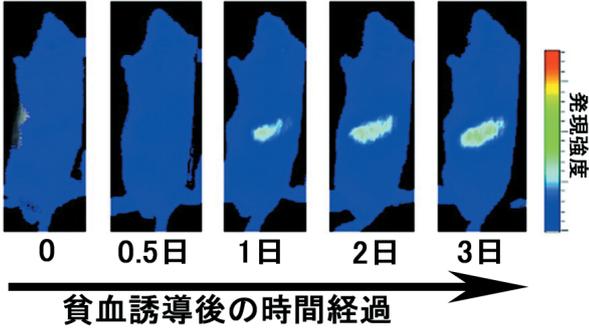


図4 非侵襲的手法を用いた *Gata1* 遺伝子とグロビン遺伝子の発現解析

*Gata1* 遺伝子とグロビン遺伝子の発現制御下でルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスを作成し、貧血からの回復期にそれぞれの遺伝子発現の経時変化を同一個体で観察した。*Gata1* 遺伝子は誘導早期に発現しすぐに消失するが、グロビン遺伝子の発現は長い間継続する。

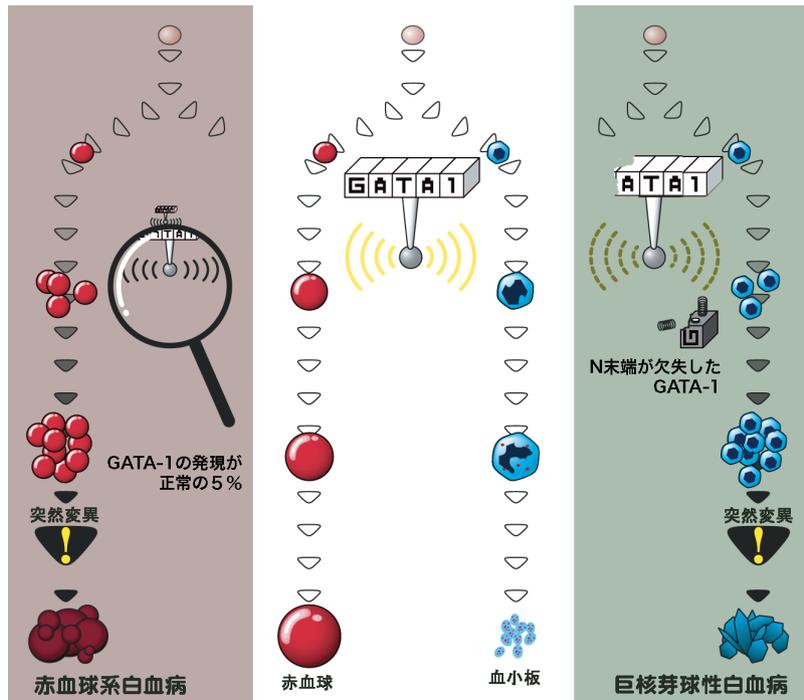


図6 GATA-1 関連白血病の発症のメカニズム

GATA-1 は赤血球や巨核球の分化に重要な役割を担っている (図中央). GATA-1 の発現が正常の5%にまで低下していると (GATA-1 の量的異常), 赤血球前駆細胞は分化できず未熟な状態で蓄積する (図左). 一方, N末端が欠失した GATA-1 しかなければ (GATA-1 の質的異常), 未熟な巨核球が分化できず未熟な状態で蓄積する (図右). いずれの場合も, このような不安定な状態に何らかの遺伝子変異が加わり, それぞれ赤血球系と巨核球系の白血病を発症する.

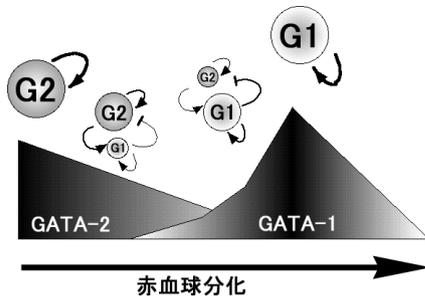


図3 GATA因子によるGATAスイッチングの制御機構

GATA-2自身により *Gata2* 遺伝子自身の転写を活性化する一方で, *Gata1* 遺伝子の発現も活性化する. GATA-1自身により *Gata1* 遺伝子の発現を活性化するので, GATA-1の発現は急速に高まる. さらに, GATA-1は *Gata2* 遺伝子の転写を抑制するので, 赤血球分化の過程で, GATA-2からGATA-1への発現スイッチが起こっている.

の発現が活性化され, それにより誘導されたGATA-1が上述の *Gata2* 遺伝子のGATA配列に結合して, 今度は *Gata2* 遺伝子の発現を負に抑制制御する (図3)<sup>16,17,42)</sup>.

*Gata1* 遺伝子の場合には, G1HEコア領域, double GATA領域, intron SP領域の3領域に存在するGATA配列がその発現に重要な役割を担っている. 実際, これらのGATA配列を欠失したレポーターマウスやノックアウトマウスの解析から, すでにこれらのシス配列が *Gata1* 遺伝子発現に重要であることが示されている<sup>25,27)</sup>. また, ChIP (クロマチン免疫沈降) 解析などの結果から, これらのGATA配列にはGATA-2とGATA-1の両者が結合していることが示唆されている. ここでは, GATA-2が *Gata1* 遺伝子の発現を最初に活性化するが, 細胞分化が進むにつれて, GATA-1がGATA-2を置換するモデルが最も理解しやすい.

ところで, ゼブラフィッシュの *Gata1* 遺伝子発現制御領域に存在する double GATA配列にホモ二量体GATA-1が結合して, *Gata1* 遺伝子の発現を活性化することが示されている. ここでは, *Gata1* 遺伝子はGATA-1自身のホモ二量体による正のフィードバック経路により, 赤血球分化に十分量のGATA-1を供給しているものと理解される<sup>43)</sup>. このように, *Gata1* 遺伝子と *Gata2* 遺伝子の発現は, 自己制御およびGATA-1とGATA-2の両因子の間で緊密なネットワーク調節機構により制御されている. すでにいくつかの総説も出ているので本稿では詳しくは触れないが, 自己制御やネットワーク制御と合わせて, GATA因子以外の転写因子も *Gata1* 遺伝子と *Gata2* 遺伝子の発現に協調的に参加しており, 重要な貢献をしている.

#### 4. G1-HRDを用いたトランスジェニック相補レスキュー法の確立

*Gata1* と *Gata2* 両遺伝子の発現は自己制御とネットワーク制御機構により, 転写レベルで調節されている<sup>41)</sup>. また, GATA-1はカスパーゼ3により分解されるが, そのカスパーゼ3の機能はエリスロポエチンシグナルにより誘導されたシャペロンタンパク質Hsp70により阻害される<sup>44,45)</sup>, さらに, GATA-2はユビキチン化されて早い速度で分解される<sup>46)</sup>ことも最近報告されている. これらの事象から, 赤血球分化過程を通して, GATA-1とGATA-2の発現量は合成と分解の両面で, ダイナミックに調節されていることが窺われる.

1990年にマウスのGATA-1 cDNAがクローン化されて以降<sup>47)</sup>, 多くの努力が傾倒されたにも関わらず, 久しく *Gata1* 遺伝子ノックアウトマウスは樹立できなかった. これは種々の複合的な要因が重なったためと考えられるが, 胚性幹 (ES) 細胞は通常雄由来なのに対して, *Gata1* 遺伝子はX染色体上にあるので, 唯一の遺伝子を破壊していることも, その理由の一つと考えられる. そこで, 私たちは“遺伝子ノックダウン”という手法を用いて *Gata1* 遺伝子改変マウスを樹立した<sup>35)</sup>. この変異マウスは, 上述した *Gata1* 遺伝子発現制御に重要なプロモーター上流域シス領域とIEエキソンの間にネオマイシン遺伝子カセットを挿入し, 同カセット中の強力なプロモーター活性と内在性の *Gata1* 遺伝子のIEプロモーターを干渉させることで作り上げたものである. このプロモーター競合により, 内在性の *Gata1* 遺伝子の発現は5%にまで減弱していたので, この変異アリルは「GATA-1.05」と命名された. 通常の5%のGATA-1発現量では胎児造血を支えるためには不十分であり, GATA-1.05/Yマウスは強度の貧血により, 胎生11.5日までに致死となる. 一方, 他の二つのグループが通常の方法で, *Gata1* 遺伝子の完全欠失マウスの作製に成功しているので, *Gata1* 遺伝子はターゲッティング可能な遺伝子であった. *Gata1* 遺伝子完全欠失マウス雄もGATA-1.05変異体雄の場合と同様に胎生11.5日までに致死になるので, GATA-1.05変異体の表現型は限りなく完全欠失マウスのそれと近いことは明らかであるが, しかし, 後段で記述するように, GATA-1.05変異体はES細胞培養系を用いた実験や個体解析において, 完全欠失変異体とは異なる興味深い表現型を呈する.

ところで, G1-HRDは前述の四つのGATA-1調節領域 (図2A)を含み, レポータートランスジェニック法で検討すると, 胎児型および成体型造血における *Gata1* 遺伝子発現をほぼ忠実に再現することができる<sup>22)</sup>. しかし, このような発現解析は写真で言えばスナップショットであり, G1-HRDが実際の個体発生の諸局面で必要・十分量の

GATA-1を発現・供給しているのか否かには、さらに生理学的な検証を加える必要がある。そこで、GATA-1 cDNAを発現するトランスジェニックマウスを作製し、それをGATA-1.05/Xマウスと交配してGATA-1トランスジーンによるGATA-1.05/Yマウスの胎生致死からのレスキュー手法(トランスジェニック相補レスキュー法)を確立した。実際に、G1-HRDを用いてGATA-1を発現するトランスジェニック雄マウスを作製し、GATA-1.05/Xマウスと交配すると、産まれてきたGATA-1.05/Yマウスは致死表現型からレスキューされ、血液学的異常を全く示さなくなった<sup>48)</sup>。すなわち、G1-HRDはマウスの個体発生を支えるのに十分な量のGATA-1を適切なタイミングで発現できる。一方、GATA-1 cDNAをβ-グロビン遺伝子座制御領域(β-LCR)に連結してトランスジェニックマウスを作成し、同様の交配をしても、GATA-1.05マウスは致死表現型からレスキューされなかった<sup>49)</sup>。後者の場合には、β-LCRが内在性のGATA-1とは異なった発現プロファイルでGATA-1を発現するので、赤血球系の分化障害が解消されないものと考えられる。

実際に、G1-HRDとβ-LCRにルシフェラーゼ遺伝子を連結したトランスジェニックマウスを用いて、*Gata1*とβ-グロビン遺伝子の発現を、超高感度CCRカメラを使って非侵襲的に個体レベルでモニターしたところ、*Gata1*遺伝子は貧血誘導後比較的早い時期に一過性に強く発現するのに対し、β-グロビン遺伝子の発現はやや遅れて発現が始まり、長い時間継続して発現していた(図4)<sup>50)</sup>。これらの結果は、個体の中で赤血球分化が正常に維持されるためには、まさにGATA-1が適切な時期に適切な量で発現することが重要であることを示している。後述するように、トランスジェニック相補レスキュー法は、GATA-1のドメイン機能解析や*Gata1*遺伝子の制御領域の充分性の検証に役立ち、GATA-1が系列特異的な転写因子研究の最先端を

形成することに重要な貢献をしてきた。

## 5. GATAスイッチングの生理的意義の検証

GATA-1.05アレルのヘミ接合体雄マウス(GATA-1.05/Y)は強度の貧血を示し、胎生致死であったが、一方、本変異遺伝子のヘテロ接合体雌マウス(GATA-1.05/X)は、胎生期から周産期にかけて様々なレベルの貧血を呈するものの、メンデル則から期待される数を若干下回る程度の出生数があった。貧血重症度の個体差はX染色体のランダムな不活化により、正常のアレルがどのぐらい不活性化されているかに依存しているものと思われる<sup>51)</sup>。幼少時にみられた貧血はGATA-1.05/Xマウスの成長とともに改善され、青年期には消失する。また、この雌マウスは正常に妊娠・出産することができる。したがって、GATA-1.05アレルは安定して母から娘へと受け継がれるが、決して雄マウスには受け継がれない。この遺伝学的特徴は、トランスジェニック相補レスキュー法に大きな利点を提供する。すなわち、常染色体上の遺伝子の場合と異なり、GATA-1の場合には、GATA-1発現トランスジェニック雄マウスを作製し、それをGATA-1.05/X雌マウスと交配することで、一度の交配でトランスジーンによるGATA-1.05/Yマウスのレスキュー個体を得ることが可能である(図5)。

トランスジェニック相補レスキュー法の目的でcDNAを発現させるための制御領域として、G1-HRDはたいへん優秀かつ有用であった。G1-HRDの機能に関する最も重要な情報は、トランスジェニック相補レスキュー法において、G1-HRD制御下にGATA-1 cDNAを発現するトランスジーンを持ったGATA-1.05/Yマウスは、胎生致死から完全にレスキューされるだけでなく、出生後も何ら血液学的異常を示さなかったことである<sup>48)</sup>。レスキューマウスは、何世代にも渡って生殖可能であり、現在も継代されている。これらの結果は、G1-HRDはマウス個体において、生

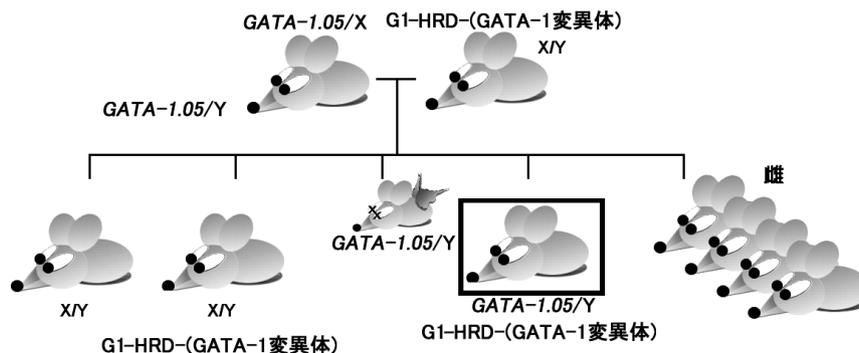


図5 遺伝子導入相補レスキュー法

トランスジーンを持つ雄マウスとGATA-1.05/Xを交配すると、8分の1の確率でトランスジーンを持ちかつGATA-1.05アレルを持つ雄(GATA-1.05/Y)が発生する。このレスキューマウスの体内ではトランスジーン由来の変異GATA-1のみで造血が支えられているので、レスキューマウスの表現型はGATA-1の機能障害が原因となっている。

理的に必要とされている GATA-1 発現量を維持するための制御領域として、必要十分であることを示している。

トランスジェニック相補レスキュー法を通して明らかになった事象の中で、GATA-2 と GATA-3 を G1-HRD の制御下に発現させることによって、*GATA-1.05/Y* マウスを胎生致死からレスキューできたことは特に興味深い<sup>48)</sup>。*GATA-1.05/Y* マウスでは、*Gata2* や *Gata3* 遺伝子座は正常なので、これらの遺伝子はそれぞれに固有の発現制御下に発現しているが、しかし、これらの GATA 因子の発現では GATA-1 欠失による胎生致死を相補することはできない。すなわち、トランスジェニック相補レスキュー法で G1-HRD の制御下に本来 GATA-1 が発現すべき時に発現すべきところで GATA-2 または GATA-3 を発現させた時のみに、胎生致死を回避できる。一方、このような機能的相補性は、内臓型 GATA 因子である GATA-4 では得られなかった<sup>52)</sup>。すなわち、血球型 GATA 因子の間でのみ認められる機能的相補性が存在する。

これらの実験結果を総合的に考察すると、血球型 GATA 因子はそれぞれの機能を効率的に発現するために、分子進化の過程でそれぞれに固有の時空間的遺伝子発現制御メカニズムを獲得したものと考えられる。すなわち、GATA-1 が機能を発揮する際に、*Gata1* 遺伝子の時空間的発現制御メカニズムは血球型 GATA 因子相互間での構造的相違を凌駕するほどの重要性を包含しているものと結論される。一方、G1-HRD-GATA-2 や GATA-3 は、胎生致死からのレスキューには十分であったが、その後の成体造血の支援は不十分で、これらのマウスは常に貧血であった<sup>48)</sup>。すなわち、それぞれの血球型 GATA 因子がタンパク質レベルでも固有の独自機能を獲得したことも理解される。

## 6. GATA-1 の機能ドメインの個体レベル解析

GATA-1 は N 末端ドメイン (NT ドメイン) と二つの Zn フィンガードドメイン (C 末端側ドメインを CF ドメイン、N 末端側ドメインを NF ドメインと呼ぶ) の三つの機能ドメインから構成されている。この中で、CF ドメインが DNA 結合ドメインであり、GATA-1 機能に不可欠であることに関しては、種々の解析を通して既に一致した結論が得られており、GATA-1 は DNA に結合して機能する転写因子である。一方、NF と NT ドメインに関して、筆者らが解析を開始するまでに得られた構造・機能関連解析の結果は、用いた実験系や検出指標により大きく揺れており、統一した結論を得るには至っていなかった。それらを要約すると、NF ドメインはパリンドローム構造をとる GATA 配列への GATA-1 結合を強固にする機能を持つ。また、NF ドメインは GATA-1 の共役因子である FOG-1 をはじめとするいくつかの転写共役因子と相互作用するが<sup>53,54)</sup>、一

方、GATA-1 の転写活性化能にそれほど重要ではないとも結論づけられていた。NT ドメインは、通常の非血液系細胞を用いたレポーターアッセイにおいて強い転写活性化能を持つが、ES 細胞を用いた分化誘導実験系などでは、CF や NF ドメインが GATA-1 の機能発現に必須であるのに対し、NT ドメインは赤血球分化にも巨核球系分化にも必ずしも必要ではない、という結果が得られていた<sup>55)</sup>。

そこで、筆者らは GATA-1 のドメイン機能をトランスジェニック相補レスキュー法により、個体レベルで解析することを試みた。その結果、CF ドメインを欠失した GATA-1 変異体では予想通り *GATA-1.05/Y* マウスの胎生致死を全く回避することができなかった。また、NF ドメイン欠失 GATA-1 変異体で *GATA-1.05/Y* マウスのレスキューを試みたところ、胎生 15.5 日までは延命させることができたが、それ以上に延命した胎児を得ることができなかった。一方、NT ドメイン欠失変異体の場合には、個体が通常に発現しているレベルよりも高いレベルで変異 GATA-1 を発現している場合のみではあったが、*GATA-1.05/Y* の胎生致死を回避することができた。しかし、通常レベルもしくはそれ以下のレベルの NT ドメイン欠失変異体の発現では、胎生 15.5 日以降に *GATA-1.05/Y* を生存させることは困難であった。一方、NT と NF 両ドメインの欠失変異体 GATA-1 では、胎生致死回避のみならず、*GATA-1.05/Y* 胎児に対する延命効果も全く得られなかった<sup>56)</sup>。

すなわち、胎児型と成体型の二つの造血で GATA-1 機能ドメインが巧妙に使い分けられており、胎児型造血においては NF ドメインと NT ドメインが相互に機能を補い合い、いずれかのドメインが存在すれば GATA-1 機能を維持することができるが、成体型造血においては、どちらのドメインもそれぞれ代償しがたい機能を有している。このように、トランスジェニック相補レスキュー法を用いた個体解析によってはじめて、三つの機能ドメイン全てが造血に必須であり、しかも単純な分化誘導系では解明することのできない、時期特異性や機能相補性の異なる機能分担をしていることが明らかとなった。

## 7. アミノ酸残基レベルでの GATA-1 の機能解析

トランスジェニック相補レスキュー法を応用することにより、個体レベルでの種々の GATA-1 の機能解析が可能になった。本手法を用いれば、前項で記述したドメインレベルでの解析から、実際のタンパク質間相互作用に関わるモチーフや 1 個のアミノ酸レベルにまで縛り込んだ転写因子の機能解析が可能となる。

GATA-1 と FOG-1 との相互作用の重要性は、FOG-1 との相互作用部位である GATA-1 NF ドメインに点変異を持つ遺伝性血小板減少症例が報告されて注目されている<sup>57,58)</sup>。

例えば、205番目のバリン残基がメチオニンに変わった(V205M)症例は、胎児期に輸血を必要としたことが報告されている<sup>58)</sup>。その後、205番目のバリン残基をグリシンに置換した(V205G)変異体を *Gata1* 遺伝子座にノックインしたマウスラインが樹立されたが、しかし、このノックインマウスは胎生期の赤血球造血不全により生児を得にくく、成獣での解析は困難であった<sup>59)</sup>。一方、トランスジェニック相補レスキュー法には、変異 GATA-1 の発現量が異なる複数のマウスラインを解析に用いることにより、目的に応じた解析を行うことができる利点がある。実際に、G1-HRD の発現制御下に内因性の GATA-1 とほぼ同等量の V205G 変異体を発現したトランスジェニックマウスでは、ノックインマウスと同様に *GATA-1.05/Y* の胎生致死を回避することができなかつた。ところが、それよりも高いレベルの V205G 変異体を発現させると、*GATA-1.05/Y* の胎生致死を回避した個体を効率よく得ることができた<sup>60)</sup>。このレスキュー個体は、定常状態では貧血を呈さず、また、成獣にまで成長した。すなわち、FOG-1 との相互作用は巨核球成熟には必須であるが、致命的貧血を生じる機能障害は過剰量の変異 GATA-1 発現により代償し得る。しかし、詳細に調べると、本レスキューマウスでは巨核球分化の後期過程が障害されており、血小板減少症を呈していた。また、本レスキューマウスは薬剤誘導による貧血からの回復が著明に遅延していた<sup>60)</sup>。このことは、一見、赤血球造血が安定しているように見えても、それは代償性の造血によるところが多く、実質的には出血などのストレス造血に対して十分に応答できない可能性を示している。したがって、このような遺伝的背景を持つ患者に対しては、貧血誘導が起きないように注意していく必要がある。

GATA-1 はホモ二量体を形成して、その活性を最大限に発揮することが示唆されていた<sup>61)</sup>。実際に、ゼブラフィッシュを用いたレポーターアッセイ系においては、GATA-1 ホモ二量体が *Gata1* 遺伝子自身の転写を活性化する<sup>43)</sup>。そこで、GATA-1 のホモ二量体化に重要な三つのリジン残基に変異を加えることにより、ホモ二量体化能が低下した GATA-1 変異体 (3KA) を作成し、トランスジェニック相補レスキュー法を用いて、この変異体の哺乳動物の血球造血における機能貢献を検討した。内因性 GATA-1 とほぼ同量の GATA-1 3KA 変異体を発現したトランスジェニックレスキューマウスでは、トランスフェリン受容体やヘム合成系酵素群の発現を十分に活性化することができず、卵黄嚢における胎児期の赤血球造血を十分に支持できなかった<sup>62)</sup>。この機能障害は、3KA 変異体を過剰量 (内在性 GATA-1 発現量の数倍) に発現させることにより、ある程度代償することができ、胎児造血期の失調を回避することができる。しかし、3KA 変異体を大量に発現させても、成人造血は回復せず、結果として胎生致死をほとんど回避

できなかつた。これらの個体の胎児肝でも、やはりトランスフェリン受容体やヘム合成系酵素群の発現が低下していた<sup>62)</sup>。すなわち、GATA-1 のホモ二量体化が、胎児型および成人型造血の両方で、GATA-1 の標的遺伝子の発現に重要な役割を担っていることが理解される。

## 8. GATA-1 機能失調と GATA 関連白血病

造血制御に重要な転写因子が、往々にして白血病における遺伝子変異の標的となるので、GATA-1 と GATA-2 の機能失調が白血病や骨髄異型性症候群の原因となることは十分に予想されていたが、長年の努力にも関わらず、GATA 因子の機能異常が原因となった白血病を久しく見いだすことができなかった。しかし、最近、ダウン症候群の新生児期に一過性に認められる類白血病反応 (TMD) とそれに引き続いて発症する巨核芽球性白血病 (AMKL) において、GATA-1 変異が高率に見いだされることが発見され、一気に白血病発症における GATA 因子の関わりが注目を浴びてきている<sup>4)</sup>。AMKL や TMD の異常細胞では、GATA-1 の NT ドメインをコードする第 2 エキソン領域に集中して変異が見いだされ、その変異により結果的に 84 番目のメチオニン残基から翻訳開始される NT ドメインを欠失した短い GATA-1 タンパク質が発現する ( $\Delta$ NT GATA-1 または GATA-1s と呼ばれる)。NT ドメインは N 末端から 83 個のアミノ酸からなり、血球分化・増殖に重要な役割を担っているドメインが集約している様子である<sup>63,64)</sup>。

ところで、ヒト症例の発見の以前から、マウスにおいて GATA-1 に関連した白血病が発見されていた<sup>3,65)</sup>。前述のように、*GATA-1.05* アリルからの GATA-1 mRNA の発現は、野生型アリルからの発現に較べて約 5% に低下している。筆者らは、本アリルを、ヘテロ接合体の雌 (*GATA-1.05/X*) を利用して継代してきたが、500 匹以上の *GATA-1.05/X* マウスの観察から、*GATA-1.05/X* は野生型コントロールと比べて生存期間が短く、脾腫と前赤芽球細胞 (c-Kit<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>-/dull</sup>) を蓄積しているマウスが高率に見られた<sup>3)</sup>。この細胞をヌードマウスに移植すると、*GATA-1.05* アリルを持つ細胞が無秩序な増殖を開始した。すなわち、*GATA-1.05/X* に見られる前赤芽球 (c-Kit<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>-/dull</sup>) 細胞は、白血病細胞であると結論される。すなわち、GATA-1 発現量の低下もまた白血病発症に関わる。

*Gata1* 遺伝子は X 染色体に存在するので、X 染色体のランダムな不活化 (lionization) により、この *GATA-1.05/X* マウスの体内には、GATA-1.05 アリルが不活化し野生型 X 染色体が活性化した細胞と、野生型 X 染色体が不活化し *GATA-1.05* アリルが活性化した細胞の 2 種類が存在する。後者の場合、*GATA-1.05* アリルからはわずかな量の GATA-1 しか発現しないので、正常の赤血球分化はできない。したがって、*GATA-1.05/X* マウスは、造血の盛んな

胎生期から幼少時期に、正常 X 染色体の不活化の程度により、さまざまな程度の貧血を呈する。この貧血はマウスが成熟して、造血とその代償機構が安定するにつれて概ね改善するが、しかし、成体の *GATA-1.05/X* マウスの造血組織には、*GATA-1* が正常レベルで発現していない「異常」細胞が存在する。この細胞は正常に赤血球・巨核球系列に分化できないので、前駆細胞のままで止まっている。したがって、*GATA-1.05* 白血病は、この分化停止している細胞が、何らかの遺伝学的刺激を受けて異常増殖を始め、やがて白血化したものと思われる。

重要な発見は、*GATA-1* を全く発現しない *GATA-1* 完全ノックアウトアレルを持つヘテロ接合体の雌 (*GATA-1-null/X*) マウスは全く白血病を発症せず、その生存曲線も野生型コントロールとほぼ同等であったことである<sup>3)</sup>。すなわち、*GATA-1* が全く発現していなければ白血病発症には関与しないが、*GATA-1* が 5% ほど発現していると白血病発症の素地が形成される。この相違は、*GATA-1* が 1) 血液細胞の分化制御に加えて、2) 前駆細胞の増殖抑制と 3) アポトーシス抑制、の 3 経路を精密に制御し、それを通して個体造血制御を達成していることに起因している。実際に、*GATA-1.05* と *GATA-1-null* の ES 細胞を、OP9 細胞を用いた分化誘導実験系で検討すると、*GATA-1-null* 細胞の場合には、赤血球・巨核球系前駆細胞の分化が抑制され、細胞増殖の抑制も解除されている。しかし、同時にアポトーシス抑制も解除されているので、蓄積した前駆細胞はアポトーシス死するために、結局、白血病を発症しない。一方、*GATA-1.05* 細胞では、細胞分化の抑制と増殖抑制の解除は *GATA-1-null* 細胞の場合と同様に起こるが、正常の 5% だけ発現している *GATA-1* がアポトーシスを回避するのに十分な貢献をするので、分化できない未熟な赤血球前駆細胞はアポトーシス死することなく増殖を続ける<sup>66)</sup>。したがって、*GATA-1-null/X* マウスの造血組織にはたくさんのアポトーシス像が見いだされるのに対し、*GATA-1.05/X* マウスの造血組織は、野生型マウスと同様に、ほとんどアポトーシス像を示さない<sup>3)</sup>。さらに、G1-HRD 発現制御下に蛍光物質 GFP を発現するトランスジェニックマウスとの交配実験から、*GATA-1.05/X* マウスの脾臓では、まだ脾腫大も見いだされない時期から、すでにたくさんの白血病細胞と同様の表面形質 (c-Kit<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>Ter119<sup>-/dull</sup>) を持つ未熟な赤血球系細胞が蓄積している<sup>3)</sup>。

ところで、トランスジェニック相補レスキュー法により、NT ドメイン欠失 *GATA-1* を用いてレスキュー個体 ( $\Delta$ NTR; *GATA-1.05/Y::\DeltaNT *GATA-1*) を樹立したが、この個体では、まさに、ヒト型の 83 アミノ酸を欠失した *GATA-1* タンパク質のみが発現しているが、このマウスを長期観察しても白血病を発症しなかった(未発表データ)。*

すなわち、AMKL や TMD の病態形成には、*GATA-1* 変異が重要な要素であるが、それ以外のさらなる遺伝子異常が発症に関与していることが示唆される。また、NT ドメイン N 末端側の 63 アミノ酸を欠失した *GATA-1* をノックインしたマウスでは、特に胎児肝で未熟な巨核球系細胞が一過性に増殖していることも報告されている<sup>67)</sup>が、この点に関しては、63 アミノ酸残基では、NT ドメインの欠失を完全に再現していない可能性があり、さらなる検証が必要である。実際に、 $\Delta$ NT *GATA-1* 変異を持ったヒト家系が同定されているが、その表現型は貧血を主徴としていた<sup>68)</sup>。

このように、*GATA-1* の構造異常と量的異常が赤血球・巨核球系列の白血病を発症する原因となる (図 6)。いずれの場合も白血病の素地となる未熟な前駆細胞は蓄積するが、しかし、*GATA-1* の単独変異では白血病を発症しない。AMKL や TMD の場合は、おそらくは 21 番染色体トリソミーそのものか、または、付随した DNA の脆弱性に起因したさらなる未知の遺伝子変異が引き金となって発症するものと考えられる。一方、筆者らは最近、*GATA-1* の量的異常による白血病発症には、マウス系統の遺伝的背景が大きく関わっていることを発見した(未発表データ)。したがって、白血病モデルマウスを用いた解析から、*GATA-1* の機能異常に関連する白血病発症メカニズムの解明に迫れるものと期待している。

## 終わりに

造血幹細胞がそれぞれの系列の血液細胞へと分化していく過程では、たくさんの系列特異的な転写因子が発現し、標的遺伝子の発現活性化を通して造血系の恒常性維持に貢献する。そして、ある分化段階を通り過ぎた細胞や終末分化を遂げた細胞では、往々にして鍵となる転写因子自身の発現は消失する。近年の研究から、血液細胞の分化・増殖には、複数の転写因子による協調的・拮抗的な転写因子自身の発現制御が大切であることが理解されてきている。さらに、それぞれの系列特異的な転写因子は、時系列の複数局面で異なった機能貢献を行うが、そこでは多くの共役因子との複合体形成がその機能形成に重要な貢献をしている。本稿では、*GATA-1* と *GATA-2* に焦点をあて、それら自身の形成する発現制御ネットワーク (「*GATA* 因子スイッチング」) やそれらの機能破綻に起因する病態 (「*GATA* 関連白血病」) について、最新の知見を紹介した。

歴史的には、造血細胞を支える系列特異的な転写因子の多くは白血病細胞の染色体異常から見いだされた後に、造血系における役割や疾患発症への関与が解析されてきた。一方、*GATA-1* と *GATA-2* は赤血球系細胞の増殖と分化に必須な因子として同定されたので、疾患関連因子としての研究の歴史は浅い。しかし、その発現制御様式、血液細胞での重要な機能貢献を考慮すると、*GATA-1* と *GATA-2* の

機能失調が様々な血液疾患の病態形成に関与している可能性は高い。ポストシーケンス時代を迎え、充実したゲノム情報を入力することが可能になった現在こそ、今まで原因の分からなかった血液疾患の病態解明の糸口として、これらの基礎的な研究が役立つことを期待する。

## 謝辞

本総説の執筆にあたり、重要な助言をいただいた筑波大学先端学際領域研究センターと東北大学大学院医学系研究科の共同研究者の方々、また、イラスト作成にご協力いただいた筑波大学芸術専門学群の田中佐代子講師および同構成専攻の川原卓也さんに、厚くお礼を申し上げます。本研究の一部は、文部科学省科学研究費助成金(がん特定研究および基盤研究)の支援を受けて実施されました。最後に、筆者らに血液学研究の面白さをご教授下さった自治医科大学 三浦恭定名誉教授および山梨大学 小松則夫教授に深謝致します。

## 文 献

- 1) Yamamoto, M., Ko, L.J., Leonard, M.W., Beug, H., Orkin, S. H., & Engel, J.D. (1990) *Genes Dev.*, **4**, 1650-1662.
- 2) Hannon, R., Evans, T., Felsenfeld, G., & Gould, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3004-3008.
- 3) Shimizu, R., Kuroha, T., Ohneda, O., Pan, X., Ohneda, K., Takahashi, S., Philipsen, S., & Yamamoto, M. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 10814-10825.
- 4) Wechsler, J., Greene, M., McDevitt, M.A., Anastasi, J., Karp, J.E., Le Beau, M.M., & Crispino, J.D. (2002) *Nat. Genet.*, **12**, 1-5.
- 5) Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (1993) *Nature*, **362**, 466-468.
- 6) Asnagli, H., Afkarian, M., & Murphy, K.M. (2002) *J. Immunol.*, **168**, 4268-4271.
- 7) Pan, X., Minegishi, N., Harigae, H., Yamagiwa, H., Minegishi, M., Akine, Y., & Yamamoto, M. (2000) *J. Biochem.*, **127**, 105-112.
- 8) Minegishi, N., Ohta, J., Suwabe, N., Nakauchi, H., Ishihara, H., Hayashi, N., & Yamamoto, M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 3625-3634.
- 9) Suzuki, N., Ohneda, O., Minegishi, N., Nishikawa, M., Ohta, T., Takahashi, S., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2202-2207.
- 10) Nagai, T., Harigae, H., Ishihara, H., Motohashi, H., Minegishi, N., Tsuchiya, S., Hayashi, N., Gu, L., Andres, B., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (1994) *Blood*, **84**, 1074-1084.
- 11) Mouthon, M.A., Bernard, O., Mitjavila, M.T., Romeo, P.H., Vainchenker, W., & Mathieu-Mahul, D. (1993) *Blood*, **81**, 647-655.
- 12) Orlic, D., Anderson, S., Biesecker, L.G., Sorrentino, B.P., & Bodine, D.M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4601-4605.
- 13) Labbaye, C., Valtieri, M., Barberi, T., Meccia, E., Masella, B., Pelosi, E., Condorelli, G.L., Testa, U., & Peschle, C. (1995) *J. Clin. Invest.*, **95**, 2346-2358.
- 14) Minegishi, N., Ohta, J., Yamagiwa, H., Suzuki, N., Kawachi, S., Zhou, Y., Takahashi, S., Hayashi, N., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (1999) *Blood*, **93**, 4196-4207.
- 15) Zhou, Y., Lim, K.C., Onodera, K., Takahashi, S., Ohta, J., Minegishi, N., Tsai, F.Y., Orkin, S.H., Yamamoto, M., & Engel, J.D. (1998) *EMBO J.*, **17**, 6689-6700.
- 16) Martowicz, M.L., Grass, J.A., Boyer, M.E., Guend, H., & Bresnick, E.H. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 1724-1732.
- 17) Grass, J.A., Jing, H., Kim, S.I., Martowicz, M.L., Pal, S., Blobel, G.A., & Bresnick, E.H. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 7056-7067.
- 18) Kobayashi-Osaki, M., Ohneda, O., Suzuki, N., Minegishi, N., Yokomizo, T., Takahashi, S., Lim, K.C., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 7005-7020.
- 19) Khandekar, M., Brandt, W., Zhou, Y., Dagenais, S., Glover, T. W., Suzuki, N., Shimizu, R., Yamamoto, M., Lim, K.C., & Engel, J.D. (2007) *Development*, **134**, 1703-1712.
- 20) Zhou, Y., Yamamoto, M., Engel, J.D., & Reddy, J.K. (2000) *Development*, **127**, 3829-3838.
- 21) Khandekar, M., Suzuki, N., Lewton, J., Yamamoto, M., & Engel, J.D. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 10263-10276.
- 22) Onodera, K., Takahashi, S., Nishimura, S., Ohta, J., Motohashi, H., Yomogida, K., Hayashi, N., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4487-4492.
- 23) Onodera, K., Yomogida, K., Suwabe, N., Takahashi, S., Muraosa, Y., Hayashi, N., Ito, E., Gu, L., Rassoulzadegan, M., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (1997) *J. Biochem.*, **121**, 251-263.
- 24) Wakabayashi, J., Yomogida, K., Nakajima, O., Yoh, K., Takahashi, S., Engel, J.D., Ohneda, K., & Yamamoto, M. (2003) *Genes Cells*, **8**, 619-630.
- 25) Nishimura, S., Takahashi, S., Kuroha, T., Suwabe, N., Nagasawa, T., Trainor, C., & Yamamoto, M. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 713-723.
- 26) Bose, F., Fugazza, C., Casalgrandi, M., Capelli, A., Cunningham, J.M., Zhao, Q., Jane, S.M., Ottolenghi, S., & Ronchi, A. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 3942-3954.
- 27) Ohneda, K., Shimizu, R., Nishimura, S., Muraosa, Y., Takahashi, S., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (2002) *Genes Cells*, **7**, 1243-1254.
- 28) Visvader, J. & Adams, J.M. (1993) *Blood*, **82**, 1493-1501.
- 29) Visvader, J.E., Elefanty, A.G., Strasser, A., & Adams, J.M. (1992) *EMBO J.*, **11**, 4557-4564.
- 30) Kulesa, H., Frampton, J., & Graf, T. (1995) *Genes Dev.*, **9**, 1250-1262.
- 31) Briegel, K., Lim, K.C., Plank, C., Beug, H., Engel, J.D., & Zenke, M. (1993) *Genes Dev.*, **7**, 1097-1109.
- 32) Heyworth, C., Gale, K., Dexter, M., May, G., & Enver, T. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 1847-1860.
- 33) Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H., & Costantini, F. (1991) *Nature*, **349**, 257-260.
- 34) Simon, M.C., Pevny, L., Wiles, M.V., Keller, G., Costantini, F., & Orkin, S.H. (1992) *Nat. Genet.*, **1**, 92-98.
- 35) Takahashi, S., Onodera, K., Motohashi, H., Suwabe, N., Hayashi, N., Yanai, N., Nabesima, Y., & Yamamoto, M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 12611-12615.
- 36) Yu, C., Cantor, A.B., Yang, H., Browne, C., Wells, R.A., Fujiwara, Y., & Orkin, S.H. (2002) *J. Exp. Med.*, **195**, 1387-1395.
- 37) Hirasawa, R., Shimizu, R., Takahashi, S., Osawa, M., Taka-

- yanagi, S., Kato, Y., Onodera, M., Minegishi, N., Yamamoto, M., Fukao, K., Taniguchi, H., Nakauchi, H., & Iwama, A. (2002) *J. Exp. Med.*, **195**, 1379–1386.
- 38) Harigae, H., Takahashi, S., Suwabe, N., Ohtsu, H., Gu, L., Yang, Z., Tsai, F.Y., Kitamura, Y., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (1998) *Genes Cells*, **3**, 39–50.
- 39) Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W., & Orkin, S.H. (1994) *Nature*, **371**, 221–226.
- 40) Minegishi, N., Suzuki, N., Yokomizo, T., Pan, X., Fujimoto, T., Takahashi, S., Hara, T., Miyajima, A., Nishikawa, S., & Yamamoto, M. (2003) *Blood*, **102**, 896–905.
- 41) Suzuki, N., Suwabe, N., Ohneda, O., Obara, N., Imagawa, S., Pan, X., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2003) *Blood*, **102**, 3575–3583.
- 42) Martowicz, M.L., Grass, J.A., & Bresnick, E.H. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 37345–37352.
- 43) Nishikawa, K., Kobayashi, M., Masumi, A., Lyons, S.E., Weinstein, B.M., Liu, P.P., & Yamamoto, M. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 8295–8305.
- 44) De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Testa, U., & Peschle, C. (1999) *Nature*, **401**, 489–493.
- 45) Ribeil, J.A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I.C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sorensen, T., Varet, B., Solary, E., Garrido, C., & Hermine, O. (2007) *Nature*, **445**, 102–105.
- 46) Minegishi, N., Suzuki, N., Kawatani, Y., Shimizu, R., & Yamamoto, M. (2005) *Genes Cells*, **10**, 693–704.
- 47) Martin, D.I. & Orkin, S.H. (1990) *Genes Dev.*, **4**, 1886–1898.
- 48) Takahashi, S., Shimizu, R., Suwabe, N., Kuroha, T., Yoh, K., Ohta, J., Nishimura, S., Lim, K.C., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (2000) *Blood*, **96**, 910–916.
- 49) Whyatt, D., Lindeboom, F., Karis, A., Ferreira, R., Milot, E., Hendriks, R., de Bruijn, M., Langeveld, A., Gribnau, J., Grosveld, F., & Philipsen, S. (2000) *Nature*, **406**, 519–524.
- 50) Suzuki, M., Ohneda, K., Hosoya-Ohmura, S., Tsukamoto, S., Ohneda, O., Philipsen, S., & Yamamoto, M. (2006) *Blood*, **108**, 726–733.
- 51) Lyon, M.F. (1961) *Nature*, **190**, 372–373.
- 52) Hosoya-Ohmura, S., Mochizuki, N., Suzuki, M., Ohneda, O., Ohneda, K., & Yamamoto, M. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 32820–32830.
- 53) Crispino, J.D., Lodish, M.B., MacKay, J.P., & Orkin, S.H. (1999) *Mol. Cell.*, **3**, 219–228.
- 54) Trainor, C.D., Omichinski, J.G., Vandergon, T.L., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., & Felsenfeld, G. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2238–2247.
- 55) Weiss, M.J., Yu, C., & Orkin, S.H. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1642–1651.
- 56) Shimizu, R., Takahashi, S., Ohneda, K., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (2001) *EMBO J.*, **20**, 5250–5260.
- 57) Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M., & Orkin, S.H. (1997) *Cell*, **90**, 109–119.
- 58) Nichols, K.E., Crispino, J.D., Poncz, M., White, J.G., Orkin, S.H., Maris, J.M., & Weiss, M.J. (2000) *Nat. Genet.*, **24**, 266–270.
- 59) Chang, A.N., Cantor, A.B., Fujiwara, Y., Lodish, M.B., Droho, S., Crispino, J.D., & Orkin, S.H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **14**, 9237–9242.
- 60) Shimizu, R., Ohneda, K., Engel, J.D., Trainor, C.D., & Yamamoto, M. (2004) *Blood*, **103**, 2560–2567.
- 61) Mackay, J.P., Kowalski, K., Fox, A.H., Czolij, R., King, G.F., & Crossley, M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 30560–30567.
- 62) Shimizu, R., Trainor, C.D., Nishikawa, K., Kobayashi, M., Ohneda, K., & Yamamoto, M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 15862–15871.
- 63) Kuhl, C., Atzberger, A., Iborra, F., Nieswandt, B., Porcher, C., & Vyas, P. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 8592–8606.
- 64) Muntean, A.G. & Crispino, J.D. (2005) *Blood*, **106**, 1223–1231.
- 65) Takahashi, S., Komeno, T., Suwabe, N., Yoh, K., Nakajima, O., Nishimura, S., Kuroha, T., Nagasawa, T., & Yamamoto, M. (1998) *Blood*, **92**, 434–442.
- 66) Pan, X., Ohneda, O., Ohneda, K., Lindeboom, F., Iwata, F., Shimizu, R., Nagano, M., Suwabe, N., Philipsen, S., Lim, K.C., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **6**, 22385–22394.
- 67) Li, Z., Godinho, F.J., Klusmann, J.H., Garriga-Canut, M., Yu, C., & Orkin, S.H. (2005) *Nat. Genet.*, **37**, 613–619.
- 68) Majewski, I.J., Metcalf, D., Mielke, L.A., Krebs, D.L., Ellis, S., Carpinelli, M.R., Mifsud, S., Di Rago, L., Corbin, J., Nicola, N.A., Hilton, D.J., & Alexander, W.S. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 14146–14151.