

〈総説〉

## 緑色蛍光蛋白質とフローサイトメトリーが拓く バイオテクノロジー研究の可能性

峯岸直子<sup>1</sup>

### Potency of the Flowcytometric Analysis Based on Green Fluorescent Protein Accumulation in Biotechnology Research

Minegishi Naoko<sup>1</sup>

#### Abstract

The green fluorescent protein (GFP) is a protein extracted from the jellyfish, and produces the fluorescence similar to that of fluorescein isothiocyanate within living cells. Using flowcytometry, we can analyze and sort the cells expressing GFP fluorescence to accomplish the cellular and molecular biological experiments. We made the transgenic mice lines, and the knock-in mice, which had the GFP expression where endogenous GATA-2 gene was expressed. The GATA-2 is a transcription factor essential to the hematopoiesis, but its exact roles are not clarified yet. These mice produced the fluorescence in the hematopoietic and neural cells mimicking the transcriptional activity of the GATA-2 gene in individual cells. The fraction of the GFP expressing cells in the fetal liver, sorted by flowcytometry, had the high hematopoietic-colony-forming activities, indicating the GATA-2 expression in the hematopoietic progenitor cells. Further, we used the GFP to identify the cells infected by the retrovirus, and revealed the inhibitory role of GATA-2 to produce hematopoietic cells from their precursor mesenchymal cells. Thus, our experiments now heavily depend on the GFP, and the GFP techniques with flowcytometry would be the strong tool to reveal the physiological molecular mechanisms in the individual cells forming mammalian tissues.

Key words : green fluorescent protein, flowcytometry, GATA-2, transgenic mouse, retrovirus

#### はじめに

クラゲから取られた緑色蛍光蛋白質 GFP (Green Fluorescent Protein), 特に, アミノ酸配列に変異を導入した長波長型 GFP は, FITC (fluorescein isothiocyanate) と重なる励起波長 (excitation spectra) と蛍光波長 (emission spectra) を持つ. GFP を発現する細胞は, 固定等の処理をしないままフローサイトメトリー (FCM) を使って解析でき, 生きたまま GFP 発現細胞を単離 (ソート) し, 細胞生物学的な解析, 発現する遺伝子とその分子機構, 生体内での運命などの検討を行うことができる<sup>1)</sup>. さらに, GFP とともに, 種々の表面抗原に対する抗体や, 波長の

異なる蛍光蛋白質等を用いれば, 多重解析が可能である. これは, 種々の細胞が錯綜する個体を扱う研究者にとって大きな福音である. バイオテクノロジーの手法が進み, どのような遺伝子も個体レベルの機能解析を求められる時代になったが, 従来の解析法では個々の遺伝子を発現する細胞を同定することはできても, それらの機能的な解析を行うことはできなかった. GFP の利用により個体を形成する細胞を使つての研究が始まりつつあり, FCM はその重要な手段である. そこで, 本稿では, 我々の行っている研究を例に, GFP を使つた実験の概略と可能性について検討する.

1. 筑波大学医療技術短期大学部 衛生技術学科 〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1  
1. College of Medical Technology and Nursing, University of Tsukuba, Ibaraki.

## 1) FCMの原理

FCMは個々の細胞にレーザービームをあて、散乱光と蛍光を検出して、数値として測定するシステムである<sup>2), 3)</sup>。細胞を含むサンプル液はシース液の中央で層流をつくって流れ、フローセルと呼ばれるレーザービーム照射部位を通過する。レーザー光が細胞にあたって発生した散乱光と蛍光は、レンズで集光され、光学フィルターを通過して検出器に入り、光学信号に比例した電気信号となって各細胞ごとに出力され、コンピューターに保存される。励起には通常488nmのアルゴンレーザーが使われている。第2レーザーとして長波長側のレーザー(635nmのものなど)が搭載されている機種、近頃では、さらにUVレーザーを搭載している機種も、細胞周期の解析やカルシウム流入の実験等に用いられている。

レーザービームが細胞に当たると、同じ波長のまま散乱する。この散乱光をレーザービームの前方で検出しているのが前方散乱光(FSC: Forward Scattered Light)であり、その強さは細胞の表面積または大きさにほぼ比例している。レーザービームの光軸に対して直角方向で検出されるのが側方散乱光(SSC: Side Scattered Light)であり、SSCの強さは細胞内の顆粒性状、内部構造にほぼ比例している。末梢血サンプルなどでは、この2つの散乱光の情報によりリンパ球、顆粒球、単球を識別することが可能である。

レーザービームにより発せられた蛍光は光軸に対して90度の位置にある光電子倍增管(Photomultiplier Tube)で検出される。488nmのレーザーによって励起される蛍光は特定の波長域のみ通過するフィルターを通し、FL1(530nm前後)、FL2(585nm前後)、FL3(650または670nm以上)の3つの検出器で検出される。複数のレーザー管(635nmのものなど)を搭載しているものでは、その波長で励起されるFL4(660nm前後など)、FL5(630nm前後など)も検出できる。

上位機種では、散乱光と各蛍光強度の範囲(ゲート)を指定して、1細胞ごとに分取(ソート)できる。これは、GFP発現細胞を生きのまま回収するほぼ唯一の方法である。ソートの方法としては、シース液とサンプルの流れに振動エネルギーを加えて液滴を形成し、ゲートに入る細胞を含む液滴に高電圧をかけて左右に飛ばし、用意されたチューブに回収するものが一般的である。この方法によりマイクロウェルプレートに1細胞ずつソートすることも可能である。しかし、液滴中の細胞密度が高かったり、流

速が速かったりすると、ソートの収率が下がるか、あるいは純度が低下するため、時間あたりのソート能力には限界がある。

## 2) FCMに適したGFPの開発

野生型のGFPの励起波長のピークは395nmであり、アルゴンイオンレーザーの波長域で励起すると弱い蛍光しか発生せず、紫外線による励起では細胞毒性が強い。また、37°Cでの発光が弱く、哺乳類ではあまり使われないコドンが多いなどの欠点があった。そこで、遺伝子変異の導入によりFCM解析に向けたGFPが開発された<sup>1)</sup>。筆者らは京都大学の故梅園和彦先生のグループで作られた変異GFP遺伝子とEGFP(enhanced green fluorescent protein, クロンテック)を使ってトランスジェニックマウスを作製し、良好なFCM解析データを得ている。EGFPの励起波長のピークは490nm前後であり、実験の目的に応じた種々のベクターが用意されていて使いやすい。

多重解析の目的では、クロンテックから蛍光の色調を変えたGFPが入手でき、EGFP/EBFP(enhanced blue fluorescent protein)、EGFP/EYFP(enhanced yellow fluorescent protein)、ECFP(enhanced cyan fluorescent protein)/EYFP、EGFP/EYFP/EBFPの組み合わせでの解析が可能と記載されている。しかし、EBFPを検出するには紫外線を放出するレーザー管を488nmのものと同時に使用しなければならないなどの難点があった<sup>1)</sup>。DsRedは、インド洋に棲むイソギンチャクの一つ(Discosoma)から単離された蛋白質の遺伝子をヒトでの使用頻度が高いコドンに置き換えたもので、488nmのピークを持つアルゴンレーザーで励起され、558-583nmの赤い蛍光を発し、FL2のチャンネルで検出される。細胞成分によるノイズも小さく、EGFPとの2重染色が簡単な蛍光物質である<sup>1)</sup>。

GFPおよびDsRedの発する蛍光は、導入される細胞の種を選ばず、基質やコファクター、その他の遺伝子の発現を要求しない。また、固定・染色等の操作による影響をいっさい受けず、サンプル処理による誤差が少ない。これは細胞のソーティング、遺伝子発現の定量的な解析に有利である。さらに、FCMでは個々の細胞をそれぞれ測定し表示できるので、2つのサンプルのGFP発現の差をピークチャンネルや平均的な発現量だけでなく、1つ1つの細胞のGFPの発現量で表示できる。他の蛍光物質との決定的な差異はGFPが蛋白質であり、遺伝子操作により容易に細胞内、さらには個体に発現させることができる点である<sup>1)</sup>。

### 3) 細胞内にGFPを発現させる方法

GFPは約0.8kbpの遺伝子にコードされる238個のアミノ酸からなる小さい蛋白質である<sup>1)</sup>。したがって、GFPを発現させるのみならず、GFPと他の蛋白質を同時に発現させること、GFPとの融合蛋白質を発現させることのいずれも容易である。また、蛋白質発現による生体への毒性も高くはないようである。

細胞内でのGFPの発現にはトランスフェクションやウイルス感染による方法が一般的である<sup>1)</sup>、<sup>3)</sup>。たとえば、GFPとの融合蛋白質遺伝子をトランスフェクション法により導入し、レーザーコンフォーカル顕微鏡などを用いてGFPの蛍光を指標に検討し、発現する蛋白質の細胞局在、細胞内の輸送、刺激による変化などが調べられている。我々はレトロウイルスによる感染実験において、感染細胞の同定にGFPを用いている。同一ウイルス内に目的の遺伝子と内部リボゾーム挿入部位で結んだGFP遺伝子を組み込むことにより、ウイルス感染細胞を確実に蛍光でマーキングすることができる。レトロウイルスベクターでは挿入できる遺伝子のサイズに上限があるので、小さいGFP遺伝子は有利である。

### 4) 個体内にGFPを発現させる方法

個体内で持続的にGFPを発現させる方法としては、トランスジェニックマウス法、遺伝子相同組み換えを用いたノックイン法が一般的である<sup>3)</sup>、<sup>4)</sup>。遺伝子DNA上には、蛋白質やRNAの構造を決める情報だけではなく、転写の制御情報も存在する<sup>5)</sup>。プロモーター (promoter) やエンハンサー (enhancer) と呼ばれる遺伝子発現制御領域には特有の塩基配列 (シス因子, cis-element) が存在し、それらを認識して種々の転写因子 (トランス因子, trans-element) がDNAに結合する。プロモーターは、mRNAへの転写が始まる遺伝子上の位置の5'側に接して存在する。プロモーターに結合した転写因子は、基本転写因子群やRNAポリメラーゼをリクルートして定位置に結合させ、転写開始前コンプレックスの形成から転写開始反応へと導く。すなわち、プロモーターは転写開始点と転写の方向性の決定、基本的な転写開始反応に関わっている。エンハンサーは、個々の遺伝子の5'側や3'側、あるいはイントロン内など、様々な場所に存在し、転写開始点からの位置、距離、転写の方向性に関係なく働き、細胞系列や発達時期、さらには、種々の環境刺激に応じた転写活性化に働くとされる<sup>5)</sup>。

トランスジェニックマウス法は、マウスの受精卵を取り出し、マイクロインジェクション法で遺伝子

を導入して胎内に戻し、この受精卵から得られた個体とその子孫の導入遺伝子発現を利用する方法である<sup>4)</sup>。全身性にGFPを発現させることが目的の場合には、ウイルス由来の強いプロモーターが使われた。しかし、組織特異的、あるいは細胞系列特異的なGFP発現を得るには、細胞系列に特異的に働くプロモーターやエンハンサーを使った実験が必要になる。そのためには、培養細胞等でよく働くプロモーターの大部分は個体発生過程で働く強い転写抑制により個体内では機能しないので、個体内で働くものを探し出さなければならない。我々は、転写因子GATA-1、GATA-2について、その遺伝子領域を検討し、血液細胞の中で、内在性にそれらの因子を発現する細胞特異的に遺伝子を発現する能力をもつ遺伝子領域を特定し、この領域をつかってGFPを個体内に発現させた<sup>6)</sup>、<sup>7)</sup>。

トランスジェニックマウス法に用いられる遺伝子領域は、プロモーターとエンハンサー等を含む数キロベースであることが多いが、数10キロベースを含む大腸菌人工染色体、数100キロベースを含む酵母人工染色体なども用いられている<sup>8)</sup>。しかし、これら巨大な遺伝子領域であっても、1つの遺伝子の発現に必要な領域をすべてカバーしているわけではない<sup>8)</sup>。また、トランスジェニックマウス法では導入された遺伝子断片は染色体の中にランダムに挿入され、挿入部位の染色質の影響を受けた発現をする<sup>4)</sup>。そのために、異所性の遺伝子発現や遺伝子発現の減弱等が見られることがある。

そこで、もっとも忠実に内在性の遺伝子発現を反映するために、ノックイン法が用いられる。これは、遺伝子ターゲティングの手法により、胎生幹細胞のもともとの遺伝子座の1つに遺伝子相同組み換え法により外来の遺伝子 (この場合GFP遺伝子) を組み込み、発生学的に胎生幹細胞由来のマウスを造り出して解析する方法である<sup>9)</sup>。我々はGATA-2遺伝子座にGFPをノックインしたマウスを作成し、現在解析中である。ただし、この方法によっても、GFP蛋白質の半減期が1日と長いので、半減期の短い蛋白質をコードする遺伝子については、内在性の発現を必ずしも忠実に反映しない場合があると考えられる<sup>1)</sup>。

### 5) 細胞の調製法

浮遊系の細胞や骨髄や末梢血の細胞などは、そのままFCMに持っていきけるが、接着性の培養細胞、動物個体からのサンプルは単細胞浮遊液にする必要がある<sup>6)</sup>、<sup>7)</sup>。いくつかの方法があるが、われわれがマ

ウスの胎仔の解析に用いている方法は、実体顕微鏡下に必要な部分を取り出し、細切後、蛋白質分解酵素（トリプシン、コラゲナーゼ、ディスパーゼ）やキレート剤（EDTA）を使って細胞浮遊液を調製する方法である。細胞の集塊があるとサンプルが詰まりやすくなり、また、ソートする効率も落ちるので十分に細胞を解す必要があるが、あまり強い条件で処理すると、死細胞が増え、生きている細胞でもソート後の実験に支障をきたす。また、トリプシンなどの酵素処理した場合、表面抗原の抗体との反応性が失われることがあるので注意する。

細胞分散中に死んだ細胞のDNAが周囲に放出され、高分子のDNAに細胞が凝集し、細胞の塊ができることがある。遠心操作の前後にDnase入りのバッファーを用いるとこの細胞の塊化を防げる。また、遠心操作をすると凝集ができやすいので、遠心操作を極力少なくする方法を使っている。大きなチューブのまま洗浄操作を繰り返すと、チューブの壁に細胞が付着してしまい、回収率が落ちることがある。FCMにかける直前にナイロンメッシュを通して凝集塊を除く。

EGFPの蛍光が細胞自体の持つ自家蛍光と紛らわしい場合があるので、必ず、同種の細胞によるEGFPを発現しない陰性コントロールのサンプルをつくっておく。特に、死細胞は自家蛍光が高く解析の邪魔になるので、propidium iodide (PI) を1  $\mu$  g/mlになるように加えて死細胞を染色し、解析のゲートから除く。PI色素は死細胞の細胞膜のみ通過し、DNAを赤い蛍光で染色する。

GFPは分子量の小さな可溶性蛋白質であり、エタノール固定などで流出してしまう<sup>1)</sup>。したがって、細胞質の抗原、核の抗原等に対する抗体との2重解析はそのままでは困難であり、フェルネシル化された膜結合型のGFPを使うなどの工夫が必要である。どうしても細胞を固定する必要がある時は、パラホルムアルデヒド固定が比較的蛍光の損失が少ない<sup>1)</sup>。

#### 6) FCMによるデータの取り込みとソート

機器を立ち上げ、解析ソフトであるCellQuestを立ち上げ、解析に必要なウィンドウを作製し、機器の調整、ファイルの保存先等の条件を入力する<sup>2), 3)</sup>。レーザーが安定したら、検出器の感度、閾値など必要な設定を行い、解析する。多重解析の場合は、FL1とFL2、FL2とFL3、FL3とFL4のチャンネル間の蛍光の漏れの補正（コンペンセーション）が必要である。細胞の条件（Region, Gate）を設定し、液滴形成の条件、液滴の流れ、右・左・中央に振り分ける時

の流れ方の条件、ソートモードなどを決定し細胞をソートする。サンプルにかける空気圧が高いと、シース液流中のサンプルの部分が太くなり、細胞の流路が中心よりずれ安くなり、FSCや蛍光のばらつきに影響する。あまり流速を早くしないほうがきれいな結果が得られる。ソートした細胞の一部を使ってもう一度FCM解析し（リアナリシス）、ソートの純度を検定する。

#### 7) GATA-2 遺伝子の造血組織個体発生における発現と機能の解析

哺乳類の造血は卵黄嚢で始まり（胎児型造血）、その後、胎仔肝臓、骨髄に移行する（成人型造血）。GATA-2の遺伝子ノックアウトマウスも同時期に胎生致死となる<sup>9), 10)</sup>。また、キメラ形成実験において、GATA-2遺伝子ダブルノックアウト胎生幹（ES）細胞は成体の血液細胞に分化できない。GATA-2は、中胚葉の一部から造血幹・前駆細胞、各系列の幼弱な細胞までの諸段階に発現している。したがって、造血組織の形成に関わるのがそのいずれの発現なのかは明確ではない<sup>9), 10)</sup>。GATA-2は造血系のほかに、神経系、腎泌尿器系、間葉系など多様な組織での発現が確認されている<sup>6)</sup>。

GATA-2遺伝子の発現制御領域を使って作成したトランスジェニックマウスについて、FCMを用いた解析を行った<sup>7)</sup>。10.5日胚の神経組織を含む頭の部分、背中の部分、胎児期の造血組織の1つである卵黄嚢と肝臓、手足の原基について解析すると、卵黄嚢と肝臓ではGFPの発現があまり高くない細胞が数多くみられるのに対し、神経系におけるGFP発現細胞の蛍光強度は非常に高かった（図1）。この結果は、GFPの発現（この場合GATA-2遺伝子の発現を再現している）が、その有無だけではなく、発現の量の多少についても組織特異的に制御されていることを示している。また、胎仔肝臓でGFPを発現する細胞は、将来肝実質細胞となる細胞ではなく、CD45とc-kit陽性の幼弱な血液細胞である（図2）。この細胞をソートしてきて培養すると高いコロニー形成能が認められた。また、RT-PCRで解析したところ、確かに内在性のGATA-2の発現はGFP陽性の分画にみられた。

一方、ノックインマウス胎児では、胎児全体にGFPの緑色蛍光が広がっているが、やはり、卵黄嚢、肝臓、神経系での高い発現が見られた（未投稿）。

また、これらマウスについて、成人型造血の起源である胎生9.5から11.5日の大動脈壁とその周囲の領域（aorta-gonads and mesonephros AGM領域）の検討

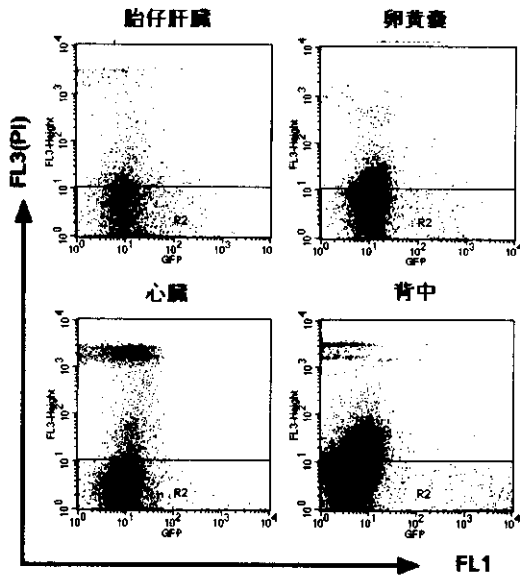


図 1. マウス胎仔を使ったFCMの実際

GATA-2遺伝子領域にGFPをつないでマウス受精卵に導入して作成したトランスジェニックマウスの10.5日胚を用いて、造血組織である胎仔肝臓、卵黄嚢、神経管が走る背中の部分、心臓を取り出し、単細胞浮遊液を作製しFCMで検討した。背中部分では神経管での蛍光を反映して、非常に強いFL1の蛍光がみられる。一方、胎仔肝臓、卵黄嚢ではGFPを発現する細胞の数は多いが、蛍光の暗いものが多い。心臓ではGFP陽性の細胞は非常に数が少ない。この結果より、個体の観察で神経系が明るく光るのは、GFP発現細胞が多数あるためというより、1つ1つの細胞のGFPの発現が高いためであることが分かる。

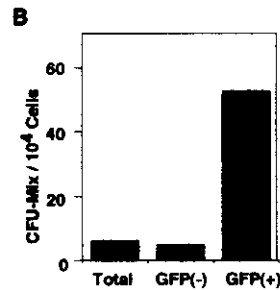
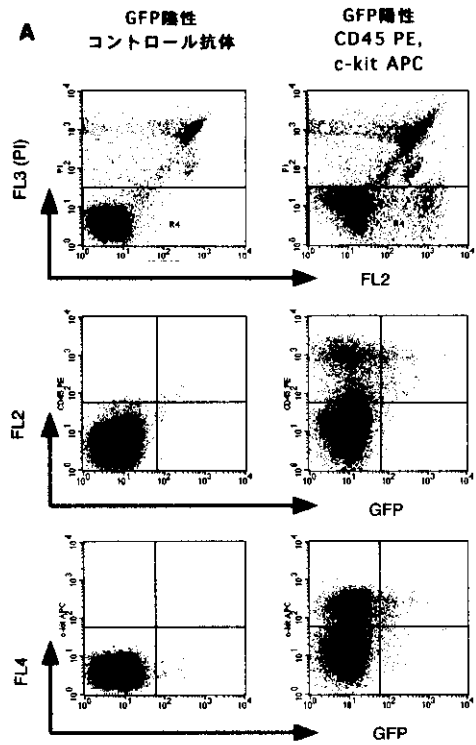


図 2. 胎仔肝臓を使ったソート実験

(A) 胎生11.5日胚より肝臓を取り出し、GFPと抗体を用いた3重解析を行った。コンペーンションをかけないとPIの蛍光はFL2とFL3のプロットのほぼ対角線にくる。FSCとSSCのプロットの画面で決めたRegionとFL3の低い領域であるR4の両方を満たす細胞をゲートして、FL1とFL2、またはFL1とFL4で解析した。GFP陰性の細胞に、コントロール抗体を加えたサンプルでも、ごく少数の細胞がFL1陽性のところに来るが、この細胞はFL2も高いので死細胞の可能性が高い。GFP陽性のサンプルについて、フィコエリスリン (PE) 標識のCD45抗体、アロフィコシアニン (APC) 標識のc-kit抗体を用いて染色すると、GFP陽性細胞はFL2、FL4の蛍光を発生し、GFP陽性の細胞の多くがこれらの抗体を発現していることが分かる。(B) この細胞をソートしてコロニー形成能をみると、GFP発現する細胞の分画において、血液細胞のコロニーの形成が高い確率で見られた。

を行った。GFPは大動脈の壁に沿って存在する、血液細胞のマーカータを持たない付着性細胞に発現しており、内在性のGATA-2の発現も同細胞で高かった。このGFP発現細胞を骨髄間質細胞上、あるいは液性因子とともに培養すると、高率に血液細胞に分化・増殖し、それにしたがってGFPおよび内在性GATA-2の発現が低下した。AGM領域にはヘマンジオブラストと呼ばれる血管内皮と血液細胞に共通の前駆細胞が存在しており、GFPの蛍光はこのような細胞におけるGATA-2発現の消長を再現していると思われた（投稿準備中）。

この血液細胞の前駆細胞におけるGATA-2発現の役割を、レトロウイルスを使った過剰発現実験により検討した（図3）。GATA-2遺伝子とGFP遺伝子を内部リボゾーム挿入部位（IRES）で結合してレトロウイルスに組み込み、感染細胞をGFPの蛍光により識別した。レトロウイルスによるGATA-2の発現は、多くても内在性の発現の数倍以内であるが、GATA-2遺伝子座の負の制御を受けずに常にほぼ一定量が発現する。その結果、コントロールとして用いたウイルスに感染した細胞がCD45抗原陽性の血液細胞に分化したのに対し、GATA-2を発現させるウイルスに感染した細胞ではこの分化は認められず、GATA-2の恒常的な発現が前駆細胞から血液細胞への分化を抑制していることが示された（投稿準備中）。

**終わりに**

個体レベルの実験など、蛍光蛋白質を発現する細胞が少数であったり、多種類の細胞の中に埋もれていたりする場合には、FCMは非常に解析法である。これまで、FCMは免疫学や血液学の研究者にしか馴染みがなかった。筆者らとしては、今後、発生工学、分子生物学などの分野でFCMを使ったユニークな研究が行われることを願ってやまない。

GATA因子については筑波大学山本雅之先生、および、研究室の方々を行った研究であり、FCM機器については筑波大学中内啓光先生の研究室の方々、細胞の調製法については京都大学西川伸一先生の研究室の方々、東京都臨床研究所原孝彦先生などよりご教示、ご協力をいただいた。この場を借りて深謝したい。

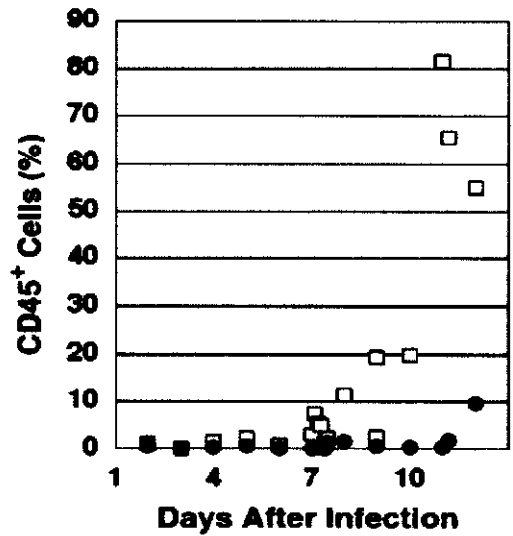


図3. 胎児大動脈付近の細胞を用いたレトロウイルス感染実験

胎児大動脈付近の細胞を酵素処理により単細胞浮遊液とし、これを増殖因子存在下に培養し、GATA-2/GFP発現レトロウイルスを感染させた。感染後数日でコントロールとしてGFPのみ発現させるウイルスを感染させた細胞（□）は血液細胞のマーカータCD45を発現し、浮遊してくるが、GATA-2過剰発現ウイルスを感染させた細胞（●）ではこのような細胞の産生は認められなかった。

**文献**

- 1) Charlfie M., & Kain S. : Green Fluorescent Protein. Properties, applications, and protocols. Wiley-Liss, Inc., p45-120, 1998.
- 2) Ormerod M. G. : Flow Cytometry A practical Approach. 2<sup>nd</sup> ed., Oxford University Press Press, p1-54, 1994.
- 3) Galbraith D. W., Anderson M. T., & Herzenberg L. A. : Flowcytometric analysis and FACS sorting of cells based on GFP accumulation, Green fluorescent proteins, Sullivan, K. F., Academic Press, p315-341, 1999.
- 4) Hogan B, Beddington R, Costantini F., & Lacy E. : Manipulating the mouse embryo A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, 山内一也, 豊田裕, 岩倉洋一郎, 森庸厚, 佐藤英明: マウス胚の操作マニュアル, p217-294, 近代出版, 1997.

- 5) 石井俊輔：転写因子の機能，転写制御複合体形成のダイナミクス，1. ヒストン修飾酵素とクロマチン構造，蛋白質核酸酵素，45 (3)：1415-1417, 2000.
- 6) Minegishi N., Ohta J., Suwabe N., Nakauchi H., Ishihara H., Hayashi N. & Yamamoto M. : Alternative promoters regulate transcription of the mouse GATA-2 gene. *J. Biol. Chem.*, 273 (6) : 3625-3634, 1998.
- 7) Minegishi N., Ohta J., Yamagiwa H., Suzuki N., Kawauchi S., Zhou Y., Takahashi S., Hayashi N., Engel J. D. & Yamamoto M. : The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood*, 93 (12) : 4196-4207, 1999.
- 8) Zhou Y., Lim K.-C., Onodera K., Takahashi S., Ohta J., Minegishi N., Tsai F.-G., Orkin S. H., Yamamoto M. & Engel J. D. : Rescue of the embryonic lethal hematopoietic defect reveals a critical role for GATA-2 in urogenital development. *EMBO J.* 17 (22) : 6689-6700, 1998.
- 9) Tsai F.-Y., Keller G., Kuo F.C., Weiss M., Chen J., Rosenblatt M., Alt F. W. & Orkin S. : An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, 371 (6494) : 221-226, 1994.
- 10) Tsai F.-Y. & Orkin S. H. : Transcription factor GATA-2 is required for the proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*, 89 (10) : 3636-3643, 1997.