

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22790298

研究課題名(和文) 白血病関連転写因子 AML1 / Runx1 の新規機能制御メカニズムの探索

研究課題名(英文) Investigation of the novel mechanisms regulating AML/Runx1

研究代表者

横田 明日美 (Yokota, Asumi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00571556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：造血発生において必須の転写因子Runx1のC末端領域に存在するリン酸化修飾の標的となり得る9箇所のセリン・スレオニン残基を対象として、脱リン酸化状態を模倣するアラニンへの置換、またはリン酸化状態を模倣するアスパラギン酸への置換を行い、転写活性化能およびES細胞の血球への分化誘導能について検討を行った。9箇所全てのアラニン変異体、アスパラギン酸変異体は、いずれも野生型Runx1と比べて転写活性化能に変化が認められた。また、両変異体共にES細胞の血球分化を誘導し得たが、血球コロニーの出現頻度に差が認められ、リン酸化修飾によるRunx1の機能調節が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There are nine serine/threonine residues in the C-terminal region of mouse Runx1, which are capable of being phosphorylated. We have made two Runx1 mutants; Dephospho-mimetic 1-9A and phospho-mimetic 1-9D mutant, of which all of these serine/threonine residues were mutated to alanine or aspartic acid, respectively. In luciferase assay, transcriptional activities of these mutants were affected compared with WT Runx1. However, protein expression levels or intracellular localizations were not changed. Next we have established Runx1 mutant-KI ES cells. 1-9A or 1-9D mutant has been knocked-in to Runx1-KO ES cells. Both 1-9A and 1-9D KI ES cells could differentiate toward hematopoietic cells, indicating that these mutants retain their activity, which could rescue the differentiation blockade of Runx1 KO ES cells. As the frequencies of hematopoietic colonies were affected by these mutations, it is suggested that phosphorylation status of Runx1 might regulate its biological activity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：Runx1 翻訳後修飾 転写因子

1. 研究開始当初の背景

AML1/Runx1 は、急性骨髄性白血病で高頻度にみられる 8 ; 21 染色体相互転座の転座切断点の分子クローニングを通じて同定された転写因子であり、CBFβ と会合してヘテロ二量体を形成し、GM-CSF 受容体、M-CSF 受容体、ミエロペルオキシダーゼなどの造血に関わる一連の標的遺伝子群の転写調節に関与することが知られている。染色体転座によって Runx1 は ETO などと融合蛋白を形成し、このような融合型 AML1 は野生型 AML1 の機能を *trans*-dominant に抑制して血球分化に障害をきたす。このように、Runx1 は当初白血病に関連して同定された遺伝子であったが、その後 Runx1 欠損マウスの作出とその解析によって Runx1 が造血初期発生制御において中心的役割を担うことが示され (Okuda et al, *Cell* 1996 ; Wang et al, *PNAS*, 1996)。さらに、Runx1 遺伝子座に生体マーカーを導入したノックインマウスや誘導的遺伝子破壊マウスの解析結果から、Runx1 のこの作用が Aorta, Gonads, Mesonephros (AGM) 領域から造血幹細胞が生み出される段階で機能していることや、成体における血小板造血や胸腺 T 細胞の増殖制御においてもこの転写因子が重要な役割を果たしていることなどが示されている (Hayashi et al, *J Immunol*, 2000; Taniuchi et al, *Cell*, 2002; North et al, *Immunity*, 2002, Ichikawa et al, *Nature Med*, 2004)。以上から、Runx1 が白血病発症のみならず、正常の造血発生のプロセスにおいてもきわめて重要な役割を担っていることが明らかにされたが、こうした Runx1 の生物作用がどのような細胞内外のシグナルによって制御されているのか、その機構を解明することが大きな課題となっている状況である。近年、Runx1 が様々な翻訳後修飾を受けることが示されており、アセチル化、ユビキチン化、そしてリン酸化修飾などによって、Runx1 の細胞内局在や分解、転写活性化能などが調節されるものと考

えられているものの、それら翻訳後修飾が Runx1 の造血制御機能にどのように作用するのかについてはいまだ不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では Runx1 のリン酸化修飾による正常造血機能制御に焦点を置いて探索を行い、Runx1 分子のどの部位のセリン、スレオニン残基のリン酸化が重要であるか、またそれらがどのような影響を及ぼすのかについて明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、Runx1 分子内のセリン、スレオニン残基について、リン酸化または脱リン酸化状態を模倣する変異体を作製し、Runx1 欠損マウス ES 細胞に相同組み換えにて導入することで血球系への分化障害が解除されるかどうかについて検討する。これまで、Runx1 がリン酸化を受ける部位は、ERK によるものが 4 箇所、CDK によるものが 4 箇所、HIPK によるものが 2 箇所、報告されている。これ以外にも、Runx1 の一次構造のアミノ酸配列より、ERK や CDK によるリン酸化のターゲットとなり得るセリンまたはスレオニンにプロリンが続くモチーフ (S/T) P motif は 8 箇所存在している。Runx1 欠損マウス ES 細胞へのノックインを用いた実験系により (Okuda et al, *MCB* 2000)、runt ドメインを含む exon 4 より下流の 9 箇所の (S/T) P motif を対象として、Runx1 機能制御にどの部位のリン酸化が重要であるかに関して検討を行う。まず、9 箇所のセリン、スレオニンを全てアラニン (脱リン酸化状態を模倣する) またはアスパラギン酸 (リン酸化状態を模倣する) に置換した Runx1 変異体を PCR により作製し、薬剤耐性遺伝子を含むターゲティングベクターに組み込み、Runx1 欠損マウス ES 細胞に相同組み換えにより導入する。同様に、9 箇所のリン酸化アミノ酸の変異をさまざまな組み合わせで保有する一連の Runx1 変

異体も全て作製し、並行して順次 ES 細胞へと導入する。得られた薬剤耐性獲得クローンをサザンブロット法にて解析し、single copyのみ組み込まれたクローンを複数単離して以降の実験に用いる。Runx1 変異体の組み込みに成功した ES 細胞は、メチルセルロース培地で erythropoietin、G-CSF、GM-CSF、stem cell factor (SCF)、IL-3 存在下で血液細胞への分化誘導培養を行い、Runx1 欠損マウス ES 細胞の血球系統への分化障害を解除する野生型 Runx1 の機能が保持されているかについて検討する。そして、ここで得られる結果を踏まえて、9 箇所のうちどの部位のリン酸化が Runx1 の生物学的機能、さらにはトランス活性化能や DNA 結合における親和性に重要であるかについて、アミノ酸置換を入れる部位の組み合わせを順次行い検討を進めて行く。

4. 研究成果

Runx1 の 9 箇所を全てアラニン、またはアスパラギン酸に置換した変異体 (1-9A、1-9D) を作製すると共に、1 箇所ずつの変異体および複数の箇所の組み合わせの変異体を作製した。これらについて、サイトカイン受容体である MCSFR 遺伝子のプロモーター領域に対する転写活性化能をルシフェラーゼアッセイによって調べ、野生型 Runx1 との比較を行った。1 箇所のみでの変異では、転写活性化能の変化は見られたものの、特に変化が大きい、その 1 箇所のみが重要であると考えられるような部位は認めなかった。1-9A、1-9D 変異体は、いずれも野生型と比較して有意に転写活性化能を変化させた。以上から、Runx1 分子の C 末端側領域に存在するセリン、スレオニンのリン酸化、脱リン酸化によって、Runx1 の転写活性化能は制御されていることが考えられた。これまでの報告から、翻訳後修飾によって Runx1 タンパクの細胞内での分解、局在が変化することが考えられたため、Runx1 タンパクの発現量と細胞内局在をウエ

スタンブロットティングと細胞蛍光免疫染色にて検討を行った。野生型 Runx1、1-9A、1-9D 変異体をそれぞれ HeLa 細胞に transient に発現させた結果、Runx1 タンパクの発現量に 3 者間で差は認められず、また細胞内局在についても同様であった。これらから、ルシフェラーゼアッセイで認められた転写活性化能の差は、変異体 Runx1 タンパクの分解亢進や遅延、局在の変化によるものではなく、DNA 結合能、CBF β 等共役因子との親和性などの変化によるものと考えられた。これらについては、検討を今後行っていく必要がある。

また、1-9A、1-9D 変異体を Runx1 ノックアウトマウス ES 細胞の Runx1 遺伝子座にノックインしたクローンについても、複数樹立することに成功した。これらを、Runx1 ノックアウトマウス ES 細胞に野生型 Runx1 をノックインしたクローン、Runx1 ノックアウト ES 細胞と共に、SCF、IL-3、GM-CSF、G-CSF、EPO 存在下にメチルセルロース培地にて血液細胞への分化誘導を行った。Runx1 ノックアウト ES 細胞は血液細胞への分化が完全に障害されており、この分化障害は野生型 Runx1 をノックインすることで解除可能であることから、ノックインした Runx1 変異体の血液細胞への分化誘導における活性を *in vitro* で評価可能な実験系である。この実験において、野生型 Runx1 同様、1-9A、1-9D 変異体は血液細胞コロニーを形成する能力を有していることが明らかとなった。さらに、血液細胞コロニーの出現頻度を算定した結果、1-9A と 1-9D において出現頻度に差が認められることから、血液細胞への分化における Runx1 の活性は、これらの部位のセリン、スレオニン残基のリン酸化修飾によって調節されている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

横田明日美、奥田 司、造血発生制御メカニ

ズムの今日的理解. 京都府立医科大学雑誌、
119(10); 681-693, 2010.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 三浦康生、八尾尚幸、吉岡 聡、岩佐磨佐
紀、田村彰広、佐藤 淳、横田明日美、平位
秀世、一戸辰夫、前川 平：間葉系幹細胞と
副甲状腺ホルモンを応用した造血細胞の増
幅。(O26-1)

第 36 回日本造血細胞移植学会総会(沖縄)
平成 26 年 3 月 8 日(2014)

2. Yao H, Miura Y, Yoshioka S, Iwasa M, Sato A,
Tamura A, Yokota A, Ashihara E, Ichinohe T,
Hirai H, Maekawa T: Direct Interaction with Bone
Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cells Is
Required for Hematopoietic Expansion by
Parathyroid Hormone. [Abstract #3689].

**American Society of Hematology, 55th Annual
Meeting**, New Orleans, LA, USA, December 9,
2013.

3. Ashihara E, Nakagawa Y, Yao H, Yokota A,
Miura Y, Takata K, Kitamura Y, Hirai H ,
Maekawa T: Hypoxia-Adapted Myeloma Cells
Possess Stem Cell Character. [Abstract #3088].

**American Society of Hematology, 55th Annual
Meeting**, New Orleans, LA, USA, December 8,
2013.

4. Yokota A, Hirai H, Hayashi Y, Tamura A, Sato
A, Yao H, Yoshioka S, Iwasa M, Ashihara E,
Miura Y, Maekawa T: Cytokine-STATs signalings
upregulate endogenous C/EBP β in BCR-ABL+
leukemic cells independently from BCR-ABL
signaling. [Abstract #1468].

**American Society of Hematology, 55th Annual
Meeting**, New Orleans, LA, USA, December 7,
2013.

5. Tamura A, Hirai H, Hayashi Y, Yokota A, Sato

A, Yao H, Yoshioka S, Iwasa M, Ashihara E,
Miura Y, Maekawa T: Cell-intrinsic and -extrinsic
involvement of C/EBP β in the regulation of
hematopoietic stem cells. [Abstract #1202].

**American Society of Hematology, 55th Annual
Meeting**, New Orleans, LA, USA, December 7,
2013.

6. Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Iwasa M, Sato A,
Tamura A, Yokota A, Hishita T, Ichinohe
T, Hirai H, Maekawa T: C/EBP β expressed by
bone marrow mesenchymal stromal cells is
indispensable for precursor B-cell lymphopoiesis.
[Abstract #1213]. American Society of
Hematology, 55th Annual Meeting, New Orleans,
LA, USA, December 7, 2013.

**American Society of Hematology, 55th Annual
Meeting**, New Orleans, LA, USA, December
6, 2013.

7. Yao H, Miura Y, Yoshioka S, Iwasa M, Sato A,
Hayashi Y, Tamura A, Yokota A, Ichinohe T,
Tohyama K, Hirai H, Maekawa T: Proliferation
and differentiation of hematopoietic cells by
osteogenic-induced bone marrow MSCs.

**The 75th Annual Meeting of the Japanese
Society of Hematology** (Jpn J Clin Hematol.
2013;54:346, OS-2-113), Sapporo, Oct 12, 2013.

8. Tamura A, Hirai H, Hayashi Y, Yokota A, Yao
H, Yoshioka S, Sato A, Iwasa M, Ashihara E,
Miura Y, and Maekawa T. Involvement of
C/EBP β in the regulation of hematopoietic stem
cells.

**The 75th Annual Meeting of the Japanese
Society of Hematology** (Jpn J Clin Hematol.
2013;54:437, PS-1-2), Sapporo, Oct 11, 2013.

9. 林 嘉宏、平位秀世、横田明日美、八尾尚
幸、三浦康生、芦原英司、前川 平:転写因子

C/EBPβ は骨髄系分化・増殖の誘導により
CML 幹細胞を減少させる。

第 17 回日本がん分子標的治療学会学術総会
(京都) 平成 25 年 6 月 13 日(2013)

10. Yao H, Miura Y, Yoshioka S, Hayashi Y,
Yokota A, Tamura A, Ichinohe T, Hirai H and
Maekawa T. Parathyroid hormone enhances
expansion through CDH11 in human bone
marrow mesenchymal stromal/stem cells.

AsiaCORD 2013, Scientific Symposium I-1
“New Insights into Stem Cell Biology- Stem Cell
Development & Differentiation”
(Kobe, Japan)(April 19, 2013)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部 HP
<http://dtm.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
横田 明日美 (YOKOTA, Asumi)

研究者番号：00571556

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：