

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09487

研究課題名(和文) Runx1を分子標的とする新規造血制御方法の開発

研究課題名(英文) RUNX1 as a molecular target for a novel hematopoietic regulation

研究代表者

奥田 司 (OKUDA, Tsukasa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30291587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では白血病関連転写因子RUNX1について、翻訳後修飾・会合分子探索・そして新規標的遺伝子の探索を行なった。その結果、RUNX1の新規標的遺伝子として免疫制御物質であるTRAILを特定した。TRAIL遺伝子座にはRUNX1結合配列が複数存在し、レポーター実験によってRUNX1の新規の転写標的であるものと特定した。意外なことに、RUNX1結合配列を変異や欠損させても転写調節は残存し、それは、RUNX1が他の既知転写因子と機能協調して間接的にTRAILを制御しているためであった。研究代表者らはこの転写因子をも特定し、このかたちの転写制御におけるRUNX1機能ドメインも解明した。

研究成果の概要(英文)：Runt-related transcription factor 1, RUNX1, is a frequent target of leukemia-related gene aberrations. Although a number of the transcriptional target genes have been so far identified, many should still remain to be elucidated. In this project, we identified that tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is the novel transcriptional target of RUNX1. TRAIL is a secreted cytokine or a membrane-binding molecule that functions in anti-tumor effects. We found that RUNX1 up-regulated TRAIL promoter activity, detected by the luciferase reporter assay. In this promoter region, some possible RUNX1-binding consensus sequences were found, however, a site-directed mutagenesis revealed that none of them appeared to be responsible for the activation of TRAIL transcription by RUNX1. Further analyses revealed that the proximal region was responsible for this RUNX1 transcription activity, suggesting that RUNX1 regulates TRAIL transcription by a novel molecular mechanism.

研究分野：生化学 分子生物学 腫瘍学

キーワード：白血病 造血幹細胞 リンパ球 転写因子 翻訳後修飾 RUNX1 AML1 TRAIL

1. 研究開始当初の背景

造血の発生・維持にはすべての系統の血球に分化する能力と自己複製能の両者を併せ持つ細胞である「造血幹細胞」が中心的役割を担っている。造血幹細胞の制御については、造血細胞を取り巻く微小環境をふくめた生存許容にかかわる細胞外シグナル群と、細胞内の転写因子群の活性調節によるもの、など、内外のシグナルのバランスが重要と考えられている。このなかで RUNX1 と名づけられた造血関連転写因子は造血幹細胞の初期発生や、成体での血小板造血やリンパ系細胞の分化・成熟に重要な役割を果たすことが明らかにされ、かつ、その変異はヒト白血病発症に深く関わることが知られている。

たとえば RUNX1 作用の低下がもたらす人体影響については FPD/AML 家系でよく知られている。この家系は機能喪失変異を RUNX1 遺伝子座に有することがその本態であり、理論的に半減した RUNX1 活性をもつヘテロ接合体では血小板減少による出血傾向と高率な白血病発症が観察される。

こうしたことから、造血障害の治療や白血病発症予防において、この転写因子の作用を制御することは非常に重要と考えられる。

しかしながら、RUNX1 自体の作用がどのように制御されているかは多くの不明の点が残されている。たとえば RUNX1 自体の転写制御、タンパクの半減期の制御、翻訳後修飾の意義、生物学的作用における責任標的遺伝子の特定、などを明らかにすることができれば、造血障害や白血病におけるあらたな予防・治療の分子標的として利用可能になることが予想されている。

2. 研究の目的

上述の背景に鑑み、当該研究では、RUNX1 の翻訳後修飾のもつ生物学的意義解明、RUNX1 と機能協調する生体分子の探索、そして、新たな RUNX1 標的遺伝子の探索と解析、によって、この転写因子を造血制御や疾病制御における新たな分子標的として活かす上で役立つ新知見を集積することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RUNX1 の翻訳後修飾

RUNX1 はリン酸化やメチル化などの翻訳後修飾を受けることが知られている。こうした翻訳後修飾の意義を明らかにする目的で修飾を受け得ない RUNX1 の変異体を作製し、その生化学的・生物学的意義を検討した。リン酸化を受けるセリン残基についてはアラニンやアスパラギン酸への変異を、リン酸化を受

けるチロシン残基についてはフェニルアラニンやアスパラギン酸への変異を、そしてメチル化を受けるアルギニン残基 (R) についてはリジン残基 (K) への、それぞれ、ミスセンス変異導入を行なった。変異 cDNA の作製は site-directed mutagenesis によって行なった。また、置換型ノックインベクターは既報のとおり (Okuda 他, Molecular and Cellular Biology, 2000) 約 15kb のゲノム DNA をバックボーンとする形で、変異 cDNA をエクソン部にフレームを合わせて挿入する形で作製した。

(2) RUNX1 と機能協調する生体分子の探索

酵母 two-hybrid スクリーニングによって RUNX1 との会合能を持つ候補分子の探索を行なった。候補分子については培養細胞内での共沈降実験によって細胞内会合の有無をチェックし、会合の認められたものについてはその転写活性化能や個体内での生物作用について検討を行なった。

(3) 新たな RUNX1 標的遺伝子の探索と解析

上記 (1) (2) にくわえて、当該研究では candidate gene approach によって、RUNX1 の新規標的遺伝子の探索を行なった。データベース上転写調節シスエレメントに RUNX1 結合配列を持つことが知られる遺伝子や、文献的に RUNX1 発現誘導にともなって高発現することが記述されている遺伝子を候補とし、そのプロモータ配列を直接レポーターコンストラクトにサブクローニングした。そのうえで定法どおりレポーターアッセイを用いて RUNX1 の標的となるかどうかを検討した。RUNX1 の存在によって転写の誘導が認められた場合、点変異や欠失変異をシスエレメントクローンに導入し、その転写制御様式の解析を行なった。

4. 研究成果

(1) RUNX1 のメチル化修飾

RUNX1 におけるメチル化修飾について、PRMT1 によってメチル化を受けることが知られるアルギニン (R) 206 と R210 については既にリジン (K) 残基に置換した変異 cDNA を作製し、マウス遺伝子座にノックイン導入した遺伝子改変マウスの解析によって、こうした修飾が T 細胞制御に深く関与することを明らかにしている (Mizutani 他, Br J Haematol, 2015) くわえて、近年、RUNX1 の R223 が PRMT4 によってメチル化され、これが骨髄系細胞の分化抑制に関与することが明らかにされてきている。そこで当該研究では RUNX1_R223K 変異体と、R206K:R210K:R223K トリプル変異体の両者の新規作製を作製した。現在置換型ベクターに組み込んでノックインアレルをマウス ES 細胞へ導入中である。

(2) RUNX1 と機能協調する生体分子の探索

RUNX1 のラントドメイン部分や全長 RUNX1 の cDNA を bait として yeast two-hybrid screening を行い、複数のクローンを得ている。そのうちひとつのクローン（便宜上 CRP-1）は RUNX1 と哺乳動物内で会合することを確認し、かつ、RUNX1 の転写活性化能を負に制御することを明らかにした。別プロジェクトとしてマウス個体レベルでの検討を開始している。一方、当初スクリーニングで陽性を示した別のクローンについて順次哺乳動物細胞における検証実験を行った結果、残念ながら会合能を持ったものを今のところ見出せていない。今後、別のライブラリーの使用を含めて探索を継続する予定である。

(3) Candidate gene approach による新たな RUNX1 標的遺伝子の特定

本研究を通じて研究代表者らは免疫反応やがんに対する免疫監視機構に係る成体活性物質である Tumor-necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) を新規標的遺伝子として特定した。また、その転写制御メカニズムはこれまで RUNX1 の作用メカニズムとして知られていないものであった。

その概要を下記する：

- 1) 転写調節シスエレメントの解析や文献渉猟による候補標的遺伝子探索を行っていたところ、既知の TRAIL プロモータ配列に 2 箇所 RUNX1 結合配列と 2 箇所の類似配列が存在することを見出した。この配列を用いたルシフェラーゼ・レポーターコンストラクトを作製し定法どおり検討したところ、RUNX1/CBF 依存的に転写活性化が誘導されることが見出され、この遺伝子が新たな RUNX1 標的遺伝子であることと結論付けた。
- 2) しかしながら、その作用メカニズムの解析を進めたところ、驚いたことに、これらのコンセンサス配列すべてを変異あるいは削除しても RUNX1 による調節は残存した。さらに精査をすすめ、その応答配列は、シス配列のうち RUNX1 部位を保有しない転写開始近位配列が責任部位となっていることを特定した。
- 3) 上記 2) の配列は RUNX1 配列を持たないもの実際には RUNX1 が会合していることを CHIP 解析によって見出した。この会合は間接的なものであると解釈し、さらに検討を進めたところ、最終的に、この現象において介在する DNA 結合タンパクが何であるかを特定することができた。じっさい、RUNX1 とこの DNA 結合タンパクが直接細胞内で会合することを実証実験によって明らかにした。
- 4) 今回見出された RUNX1 による間接的シス配列制御作用は DNA 結合能を持たない白血病関連 RUNX1 変異体でも保有されていた。一方、転写活性化ドメインを

持たないドミナントネガティブ変異体ではこの作用は失われていた。すなわち RUNX1 がいわゆる「転写因子」として振舞うのではなく、転写の「コファクター」として機能する例が初めて観察されたものと解釈している。

- 5) TRAIL はがんに対する免疫監視機構に深く関わることから RUNX1 とこの DNA 結合タンパクとの協調作用は、今後の腫瘍臨床のあらたな分子標的としての可能性を指し示しているものと考えられる。

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4件)

吉田達土、山崎健太、忠垣憲次郎、奥田 司 . 特集「腫瘍の生化学と分子生物学：最新の理解」造血の転写制御と白血病. 京都府立医科大学雑誌. 124 (12), 797 ~ 812, 2015 . <http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/jkpum/pdf/124/124-12/yosida12412.pdf> (査読なし)

奥田 司、山崎健太、細井 創、奥田 司 . 特集「腫瘍の生化学と分子生物学：最新の理解」クロマチンリモデリングの異常と腫瘍発生. 京都府立医科大学雑誌. 124(12), 825 ~ 838, 2015 . <http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/jkpum/pdf/124/124-12/kuwahara12412.pdf> (査読なし)

奥田 司 . 染色体再構成による白血病発症機序 : t(8;21) と AML/RUNX1 . 白血病学(上) . 日本臨床 74 巻増刊号 8, 247-255, 2016. (査読なし)

奥田 司 . 染色体再構成による白血病発症機序 : inv(16) と CBFβ-MYH11 . 白血病学(上) . 日本臨床 74 巻増刊号 8, 256-260, 2016. (査読なし)

[学会発表](計5件)

Yoshida T and Okuda T . Elucidation of the repression mechanism in AML1/Runx1 transcriptional activity by CRP1. 第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2015 年 10 月 10 日 .

Yoshida T, Nakamura K, Mizutani S, and Okuda T . A functional repressor for Runt-related transcription factor 1/Acute Myeloid Leukemia 1. 第 77 回日本血液学会学術集会 (金沢) 2015 年 10 月 18 日 .

Yoshida T, Yamasaki K, Tadagaki K, Kuwahara Y, and Okuda T . A natural inhibitor of Runt-related transcription factor 1 / Acute

Myeloid Leukemia 1 (RUNX1/AML1).
第 89 回日本生化学会大会 (仙台)
2016 年 9 月 26 日
Yoshida T, Tadagaki K, Yamasaki K,
Kuwahara Y, Sakai T, and Okuda T.
A candidate target gene of
RUNX1/AML1 transcription factor
第 78 回日本血液学会学術総会 (横
浜) 2016 年 10 月 14 日、横浜
Tadagaki K, Yamasaki K, Kuwahara Y,
Yoshida T, and Okuda T. Candidate
target genes of hematopoietic
transcription factor RUNX1 (AML1).
第 79 回日本血液学会 (東京) 2017
年 10 月 21 日

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者 ()

〔図書〕(計 1 件)

奥田 司. 第 4 章 B-1 急性白血病、
骨髓異形成症候群 各論; AML1/RUNX1
転座と白血病. pp203~215. 造血器
腫瘍アトラス 改訂第 5 版 (谷脇雅
史・横田昇平・黒田純也・編) 日本
醫事新報社 (東京) 2016 年. (査読
なし)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 司 (OKUDA, Tsukasa)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 3 0 2 9 1 5 8 7

(2) 研究分担者

吉田達士 (YOSHIDA, Tatsushi)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号 : 8 0 3 1 5 9 3 6