

平成 22 年 3 月 14 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19790670  
 研究課題名（和文）EVI1 アセチル化機構解明と白血病治療への応用  
 研究課題名（英文）elucidation of EVI1 acetylation mechanism and the application to treatment of leukemia

研究代表者  
 山川 哲生 (YAMAKAWA NORIO)  
 宮崎大学・医学部・助教  
 研究者番号：60335825

研究成果の概要（和文）：EVI1 の 546 番目の Lysine が P/CAF によりアセチル化されることが、転写因子としての機能に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We found that acetylation of EVI1 546th Lysine by P/CAF was important for the function as a transcription factor.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,200,000 | 0       | 1,200,000 |
| 2008 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2009 年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,100,000 | 570,000 | 3,670,000 |

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：アセチル化、白血病、Evi1

## 1. 研究開始当初の背景

血球細胞の分化異常、細胞増殖異常は、白血病の成立に密接に関連している。これまでの研究により、急性骨髄性白血病(AML)では、3番染色体 EVI1 遺伝子近傍に転座が集中しており、EVI1 遺伝子発現が亢進していることが明らかになっている。EVI1 遺伝子高発現 AML は再発率も高く、決定的な治療法のない難治性である。EVI1 は細胞内でアセチル化されていることが判明しており、このことが転写因子として重要であると推測される。タンパク質はアセチル化されると、転写活性が上昇することが明らかになっており、EVI1 もアセチル化されることで転写活性が

上昇すると考えられる。

しかし、EVI1 がどのようにアセチル化されるのかそのメカニズムは不明である。そこで、本研究で、EVI1 がどのようにアセチル化されるのか、アセチル化されることが機能にどのように影響するのか明らかにしたいと考えている。

## 2. 研究の目的

EVI1 高発現白血病は、再発率も高く、決定的な治療法のない難治性である。しかも、なぜ、難治性なのか根本的な原因が明らかにされていない白血病である。EVI1 がアセチル化されていることが判明しているため、このアセチル化がどのような意義を持つのか

明らかにし、EVI1 の機能制御につなげたいと考えている。これらのことを通して、EVI1 高発現白血病の治療に応用することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 組織及び細胞染色による EVI1 アセチル化の検出

EVI1 が細胞中でアセチル化されていることが明らかになっている。しかし、常に、すべての細胞中でアセチル化されているのか、組織中でもアセチル化されているかは不明である。そこで、これらのことを明らかにするため、マウス発生期組織切片および造血幹細胞、AML 細胞で蛍光抗体染色により EVI1 のアセチル化を明らかにする。

#### (2) アセチル化酵素、アセチル化部位の同定及びアセチル化 EVI1 認識抗体の作製

EVI1 が細胞中でアセチル化されていることが明らかになっている。しかし、白血病細胞中でどのような酵素によってアセチル化されているかは判明していない。そこで、既知のアセチル化酵素と EVI1 が結合するのか明らかにしたい。また、どのアミノ酸がアセチル化されているかは不明である。そこで、アセチル化は Lysine のみに修飾されるので Lysine を Alanine に変換した変異体を作製し、活性に影響を及ぼすか検討する。その後、ウサギに同定されたアセチル化 Lysine を含むペプチドを抗原として免疫し、アセチル化部位を認識する抗体を作製する。

### 4. 研究成果

#### (1) 組織及び細胞染色による EVI1 アセチル化の検出

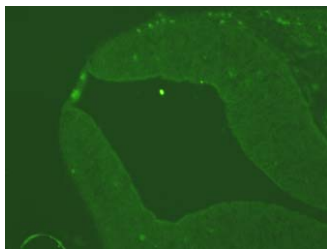


図 1、マウス胎生期 10.5 日神経管での Evl1 染色

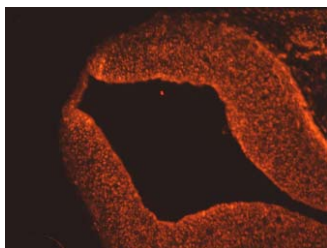


図 2、マウス胎生期 10.5 日神経管でのアセチル化 Lysine 染色

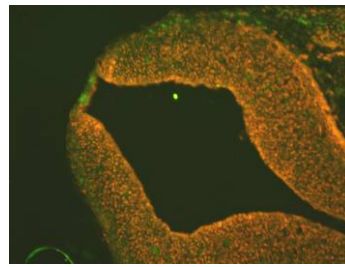


図 3、マウス胎生期 10.5 日神経管での Evl1 とアセチル化 Lysine 染色

Evl1    アセチル化    核    重ね合わせ

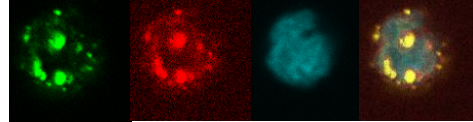


図 4、ヒト CD 3 4 +造血幹細胞染色

Evl1    アセチル化    重ね合わせ    透過

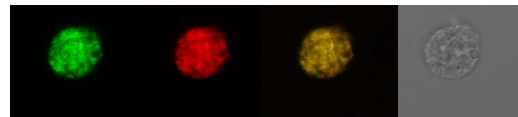


図 5、ヒト AML 細胞染色

組織及び細胞中で EVI1 がアセチル化されているか検討するため、マウス胎生 10.5 日組織切片を EVI1 抗体およびアセチル化 Lysine 抗体で染色を行った。その結果、胎生 10.5 日では EVI1 は神経管の頭頂部に染色されることが明らかになった(図 1)。しかし、同部はアセチル化 Lysine 抗体では染色されていない(図 2)。つまり、この時期の EVI1 はアセチル化されていないと考えられる(図 3)。これは、EVI1 をアセチル化する酵素が発現していないのではないかと推測される。ヒト成人造血幹細胞 (CD34+) を同様に染色すると EVI1 とアセチル化 Lysine 抗体は完全に一致して染色されることから、成人では EVI1 はアセチル化されていると考えられる(図 4)。また、AML 細胞でも同様に染色すると EVI1 とアセチル化 Lysine 抗体は完全に一致して染色されることから、白血病細胞でも EVI1 はアセチル化されていると考えられる(図 5)。これらのことは、これまで明らかになっておらず、EVI1 のアセチル化機構を解明する上で有用な知見である。

#### (2) アセチル化酵素、アセチル化部位の同定及びアセチル化 EVI1 認識抗体の作製

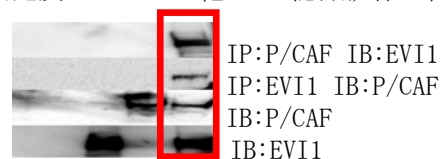


図 1、P/CAF と EVI1 の結合

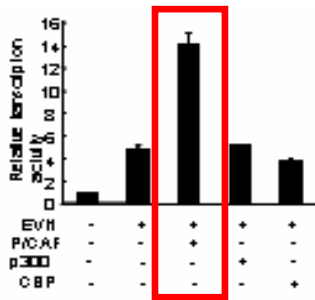


図2、P/CAFによるEVI1活性化

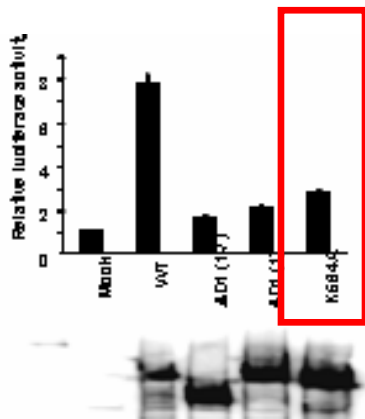


図3、564Lysine変異体の機能喪失

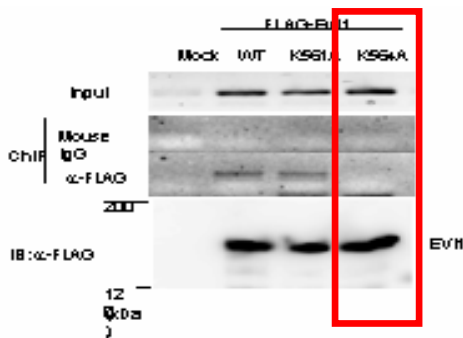


図4、564Lysine変異体のDNA結合活性消失

EVI1が細胞中でアセチル化されていることが明らかになっている。しかし、白血病細胞中でどのような酵素によってアセチル化されているかは判明していない。そこで、既知のアセチル化酵素とEVI1が結合するのか検討を行った。アセチル化酵素としてP/CAF, CBP, P300が既知であった。そこで、EVI1の下流制御遺伝子として知られているGATA2 promoterを指標としたluciferaseアッセイによりどのアセチル化酵素との組み合わせが最もEVI1転写活性が高くなるか調べた。その結果、P/CAFとの組み合わせが最もEVI1転写活性を上昇させたこと(図2)から、P/CAFがEVI1のアセチル化酵素である可能性が高まった。次に、P/CAFとEVI1が結合しているのか検討するために、免疫沈降法で調べた。P/CAFとEVI1が結合していることが明らか

かになった(図1)。P/CAFによりEVI1はアセチル化されていると考えられるので、ではEVI1のどの部位がアセチル化されているか調べた。EVI1はCtBP結合配列を2箇所持っている。これまで、CtBP結合配列近傍のLysineがアセチル化されることが明らかになっている。そこで、EVI1にはCtBP結合配列近傍Lysineが3箇所(559番, 561番, 564番)存在していたので、これらLysineをAlanineに変換した変異体を作製し、GATA2 promoterを指標としたluciferaseアッセイによりどのLysineが活性化に不可欠であるか検討を行った。564番目のLysineをAlanineに変更した(EVI1-K564A)場合のみ、EVI1転写活性化能力が喪失していた(図3)。つまり、EVI1転写活性化には、564番目のLysineがP/CAFによりアセチル化されることが重要であると考えられる。なぜ、564番目のLysineをAlanineに変更した場合のみ、EVI1転写活性化能力が喪失していたのか明らかにするため、クロマチン免疫沈降法によりGATA2 promoterへのEVI1結合能力を調べた。その結果、EVI1-K564Aのみが、バンドを検出できなかった(図4)。EVI1-K564Aは既知のEVI1結合配列に対するDNA結合活性がないことが判明した。しかし、これまで、タンパク質はアセチル化されるとDNA認識配列が変化することが知られており、EVI1-K564Aも認識配列が変化しているのかもしれない。EVI1とEVI1-K564Aでクロマチン免疫沈降法により結合するDNA配列を抽出し、次世代シーケンサーなどで網羅的に比較解析すれば認識配列が変化しているのか、完全にDNA結合活性が消失しているのか明らかになるだろう。現在、これらの結果を投稿中である(JBC, revised)。

## 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)

[学会発表] (計10件)

1. 山川哲生、Evi1高発現白血病におけるITGA6/B4依存性細胞接着、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日、パシフィコ横浜
2. 山川哲生、Evi1による細胞接着機構の解明、第82回日本生化学会大会、2009年10月24日、神戸ポートアイランド
3. 山川哲生、Evi1による細胞接着機構の解明、平成21年度造血管腫瘍研究会、2009年10月30日、東京大学
4. 島原明子、山川哲生、EVI1によるGATA-2転写活性化にはPCAFによるCtBP結合領域のリシンアセチル化が必須である、第

- 3 1 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド
5. 山川哲生、Evi1 による細胞接着機構、平成 20 年度造血器腫瘍研究会、2008 年 11 月 21 日、東京大学
  6. 島原明子、山川哲生、EVI1 による GATA-2 転写活性化には PCAF による CtBP 結合領域のリシンアセチル化が必須である、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋国際会議場
  7. 島原明子、山川哲生、EVI1 による GATA-2 転写活性化には PCAF による CtBP 結合領域のリシンアセチル化が必須である、第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10 日、京都国際会館
  8. 島原明子、山川哲生、EVI1 依存性 GATA-2 発現を伴う急性骨髄性白血病の機能解析、第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月 11 日、パシフィコ横浜
  9. 山川哲生、白血病細胞での E v i 1 の特異的なアセチル化部位の同定、平成 19 年度造血器腫瘍研究会、国立がんセンター
  10. 島原明子、山川哲生、E V I 1 高発現細胞における G A T A - 2 遺伝子転写活性化機構の検討、2006 年 10 月 06 日、福岡国際会議場

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：細胞接着阻害剤及びその用途

発明者：森下和広、山川哲生

権利者：国立大学法人宮崎大学

種類：特許

番号：特願 2009-41204

出願年月日：2009/02/24

国内外の別：国内

名称：物質を細胞内へ導入するために用いるエマルジョン及びそれを用いた物質導入方法

発明者：清水正高、西片奈保子、森下和広、

山川哲生、酒井美穂

権利者：国立大学法人宮崎大学、宮崎県、科学技術振興機構

種類：特許

番号：特願 2007-93469

出願年月日：2007/3/30

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山川 哲生 (YAMAKAWA NORIO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：60335825

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：