

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591408

研究課題名(和文)白血病関連転写因子Runx1/AML1の翻訳後修飾による機能制御

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of the leukemia-associated transcription factor, RUNX1/AML1, through the post-translational modifications.

研究代表者

奥田 司(Tsukasa, Okuda)

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：白血病関連遺伝子RUNX1(AML1)は造血発生分化に関わる転写因子をコードする。今回RUNX1の2か所のアルギニン残基(R206/210)が受けるメチル化修飾の意義について検討した。この2箇所のRをリシンに改変した変異RUNX1蛋白は、転写活性化能がやや低減したものの、Runx1欠損マウスES細胞の造血分化を再獲得させる生物活性を保持していた。また、この変異を導入したノックインマウスでは骨髄球系、巨核球・血小板系、そしてB細胞系に明らかな変化を見出さなかった。しかしながら、このマウスでは末梢CD4陽性Tリンパ球が減少していた。RUNX1のメチル化は末梢CD4陽性細胞の維持において重要となる。

研究成果の概要(英文)：RUNX1 is a leukemia-associated transcription factor that functions in hematopoietic development, proliferation, and differentiation. In this study, biological significance of the methylation of two arginine residues (R206/210) was analyzed. To this end, we made mutant RUNX1 in which both R206 and R210 were substituted to lysine (K) that cannot be methylated by the responsible enzyme. Although this non-methylable mutant protein showed somewhat reduced trans-activating activity in vitro, it still retained the biological ability to rescue the hematopoietic defect found in Runx1-deficient murine ES cells. In addition, engineered mice that homozygously carry these R-to-K mutations showed no obvious defects in myeloid, meg/platelet, or B-cell lineages. However, the mutant mice showed reduced number for CD4-single positive T-cells for peripheral blood and spleen. Thus, our results revealed that methylation of Runx1 is important for homeostasis of the peripheral CD4+ lymphocyte population.

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 マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

*RUNX1/AML1* は急性骨髄性白血病 FAB-M2 亜型における 8;21 染色体相互転座切断点からクローニングされた遺伝子であり、転写因子複合体 PEBP2/CBF の DNA 結合サブユニットをコードする。マウスにおける標的遺伝子実験などを通じて、Runx1 は、生理作用として、造血初期発生、血小板造血、そしてリンパ球制御において重要な役割を担うことが示されてきた。また、8;21 染色体転座によって形成される Runx1-MTG8 融合遺伝子や家族性白血病や散発例におけるミスセンス変異など、白血病に関連する遺伝子変異はほぼ例外なくその転写機能の低下をもたらし、このことによって細胞分化の障害など白血病病質の獲得に寄与し、腫瘍化に関わるものとされている。他方、RUNX1 自身が受ける機能制御については不明の点が多い。

近年の多くの研究から、実際の細胞内 RUNX1 ポリペプチドはリン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、そして SUMO 化など、各種の翻訳後修飾を受けていることが明らかにされてきた。そして、こうした修飾が、少なくとも *in vitro* では、RUNX1 の生化学的特性を左右している事例がいくつか明らかにされたものの、その生物学的意義については多くの解明すべき課題が残されている状況であった。

## 2. 研究の目的

上述した背景の中、当該研究計画では RUNX1 の生物作用が翻訳後修飾によってどのように制御されているのか包括的に解明することを長期目標としている。今回研究期間では、特に、近年 RUNX1 の 2 箇所のアルギニン残基 (R206 および R210) が Protein arginine methyl-transferase 1 (PRMT1) によってメチル化を受けること、そしてこのメチル化が RUNX1 と転写のコリプレッサーである Sin3A との乖離を促すことが明らかにされたことから、このメチル化について着目し、その生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) マウス *Runx1* cDNA における R206K と R210K のダブルミスセンス変異の導入:

まず、マウス *Runx1* cDNA において R206 と R210 の両者をリシン残基 (K) に置き換える変異を導入した。これは PCR を用いる既存の targeted-mutagenesis kit (TaKaRa) を用いた。リシンはアルギニンと同様に塩基性の側鎖を持つが PRMT1 の基質とならない。本研究では、生化学的特性を保存したままメチル化され得ない変異体として、用いた。変異部のアミノ酸配列の一字表記からこの変異体を「KTAMK」変異体と呼ぶ(野生型は「RTAMR」である。発表論文 5 の図 1 (A) 参照)。

(2) ノックインベクターの作製:

既報の野生型 cDNA のノックイン導入のストラテジーと同様 (Okuda 他、MCB, 2000) マウス *RNX1* のエクソン 4 に、読み枠をあわせて全長の KTAMK-cDNA を読み込ませるかたちの置き換え型ベクターを作製した (発表論文 5 の図 S3 および図 S4 を参照)。

(3) マウス ES 細胞での相同組み換え:

ES 細胞の *in vitro* 分化実験の目的のためには既に両アレルの *Runx1* 遺伝子座を破壊した ES 細胞を用い、マウス作製のためには野生型 ES 細胞を用いて、それぞれ上記の置換型ノックインベクターを導入した。成功裏に相同組み換えを起こした ES 細胞クローンを用いて以下の実験を行なった (発表論文 5 の図 S3 および図 S4 を参照)。

(4) 転写活性化実験:

ダブルルシフェラーゼアッセイ (Promega) によって RUNX1 アルギニン変異体の転写活性化能を野生型 RUNX1 と比較検討した。CSF1R-promoter を導入したプラスミド (Zhang ら) を用いた。

(5) ES 細胞の *in vitro* 分化実験:

ES 細胞の分化実験は既報のとおり胚様体形成を経由させる方法 (Okuda 他、Cell, 1996; 同、MCB, 2000) を用いた。

(6) マウス作製および解析:

キメラマウス作製は注入法を用いて (Nishimura 他、Blood, 2004) 行なった。作製した遺伝子改変マウスはサザン法にて遺伝子型を決定し、その表現型について検討を加えた。末梢血数と分画、組織化学的検査、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原解析、そして組織免疫学的検索は既報 (Nishimura 他、Blood, 2004; Fukushima-Nakase 他、Blood, 2005) に準じて行なった。

## 4. 研究成果

(1) KTAMK 変異体では *in vitro* での転写活性化能がわずかに低下する:

上述 3(1)の方法によって成功裏に KTAMK 変異 cDNA の作製に成功した (発表論文 5 の図 S1 を参照)。そこで、まず、HeLa 細胞に強制発現させる形で CSF1R プロモータに対する転写活性化作用を検討したところ、野生型の RUNX1 に比して、わずかにその転写活性化能が下がっていることが確認できた (発表論文 5 の図 1 (B) 参照)。これは先行研究 (Zhao 他、Genes & Dev, 2008) で観察されたものと類似した結果であった。これはやはりこれらの R 残基におけるメチル化修飾が転写コリプレッサーとの会合/乖離に関与していることを示唆している。

(2) KTAMK 変異体は *Runx1* 欠損マウス ES 細胞の *in vitro* 造血レスキュー能を保持してい

る：

次に KTAMK 変異体が細胞レベルでの生物作用を保持しているかどうか検討した。マウス ES 細胞は in vitro で胚様体へと分化させると、培養の進行に伴って造血細胞が出現する。しかし *Runx1* 欠損 ES 細胞では造血細胞への分化が生じず、これによって *Runx1* 欠損マウスの成体型造血欠損の表現型を in vitro で再現することができる。ここでノックインの方法で野生型 *Runx1* を発現させると造血細胞が再出現して「造血レスキュー」が観察される。つまりこの実験系によって RUNX1 の生物作用を「細胞」レベルで評価することができる。この実験系で RUNX1 の KTAMK 変異体をノックイン導入させたと、相同組換え体 ES 細胞は、野生型 RUNX1 導入と同様に、造血レスキューされることが明らかとなった（発表論文 5 の図 2 を参照）。すなわち、RUNX1-KTAMK 変異体は転写活性化能に障害があるものの、造血初期発生における生物作用を保持していることが示唆されたことになる。

### (3)KTAMK 変異導入マウスの作製：

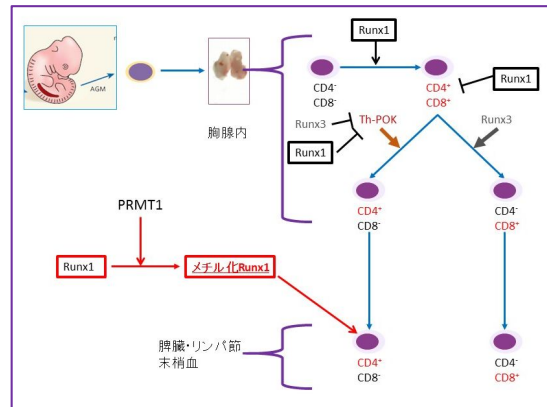
上記 4(2)の結果を受け、KTAMK ノックインマウスを作製した。ホモ接合マウスでは、PRMT1 によるアルギニンメチル化を受けない KTAMK 変異体のみが、*Runx1* 固有の転写制御を受ける形で発現することになる。遺伝子型を検討したところ、KTAMK アレルはメンデル遺伝に従った形で出現した（発表論文 5 の表 S を参照）。すなわち、4(2)で予想されたとおり、ホモ接合体は以前にノックアウトマウスで観察された胎生致死を回避し、生誕可能であり交配も可能であった。すなわち R206/210 メチル化は、RUNX1 の成体型造血初期発生にとって必須ではないことが確認できた。

### (4)KTAMK マウスにおける骨髓系造血の所見：

RUNX1 の成体での誘導的ノックアウトでは、潜伏期の後に骨髓系造血の増殖と骨髓異形成の所見が認められるものと報告されている。しかしながら今回の KTAMK マウスではその骨髓系細胞の異形成や増殖を示唆する所見は少なくとも今回の観察期間内には認められなかった（発表論文 5 の図 3、4、S5 参照）。

### (5)KTAMK マウスにおける T リンパ系細胞の所見：

KTAMK マウスでは胸腺発達や胸腺内での T 細胞分化に異常を見出すことはできなかった（発表論文 5 の図 5 (A) ~ (C)）。しかしながら脾臓における CD4 陽性 T 細胞の減少傾向を認め（発表論文 5 の図 5 (D) ~ (F)）、同様の結果は末梢血でも観察された（発表論文 5 の表 S）。結果的に CD4/8 比の低下がもたらされていた。RUNX1 は T リンパ球の発生・発達において複数の段階で重要な役割を担うことが知られている。今回の KTAMK 変異マウスの解析によって、これまで種々の誘導的



模式図：今回の検討から示唆されるメチル化 RUNX1 の T 細胞維持における役割

*Runx1* ノックアウトマウス作製によって明らかにされてきた胸腺内での T 細胞分化における働きに加え、RUNX1 が R 残基のメチル化に依存するかたちで末梢 T 細胞維持にも深く関わっていることが明らかにできたものと考えられる（模式図）。

今後、こうしたメチル化依存的な Runx1 の働きによって制御されるリンパ球集団がどのようなものであるか詳細に検討する必要がある。また、ヒト疾患との関わりについての検討を行なってゆきたいと考えている。さらに、PRMT1 を制御することによって間接的に RUNX1 機能に働きかける方策の探索へと展開させてゆければと考えている。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Mizutani S, Yoshida T, Zhao X, Nimer SD, Taniwaki M, and Okuda T. Loss of RUNX1/AML1 arginine-methylation impairs peripheral T cell homeostasis. *British Journal of Haematology* (印刷中) (査読有り)  
DOI: 10.1111/bjh.13499

山元康敏、奥田 司. 血管内皮細胞による造血幹細胞の維持. *血液内科*. 69(3):309-320, 2014. (査読なし)

山元康敏、奥田 司. 血球発生と血管分化の crossroad. *京都府立医科大学雑誌* 122(6):329-340, 2013. (査読なし)  
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/jkpum/pdf/122/122-6/yamamoto06.pdf>

### 〔学会発表〕(計 4 件)

水谷信介、谷脇雅史、奥田 司. AML1 アルギニンメチル化の喪失は末梢 T 細胞集団の不均衡を惹起する. 第 75 回日本血液学会学術総会 (札幌)

2013年10月11日

水谷信介, 谷脇雅史, 奥田 司. ジーンターゲティングアプローチによる AML1 のアルギニンメチル化修飾の生物学的意義の検討. 第 85 回日本生化学会大会 (博多) 2012 年 12 月 15 日 .

Mizutani S, Taniwaki M, and Okuda T. A Gene-Targeting Approach for the Biological Significance of AML1/Runx1 Arginine-Methylation . 第 54 回米国血液学会年次総会(アトランタ、米国ジョージア州) 2012 年 12 月 8 日 .

Mizutani S, Taniwaki M, and Okuda T. Biological significance of AML1 arginine-methylation revealed by generation of targeted-knock-in mice. 第 71 回日本癌学会学術総会(札幌) 2012 年 9 月 19 日 .

〔図書〕(計 件)

〔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：  
出願年月日：  
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・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30291587

### (2) 研究分担者

阪倉長平 (Sakakura, Chouhei)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10285257

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：