

論文の内容の要旨

論文題目 AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues

和訳 p300 を介する AML1 のアセチル化による機能制御

指導教官 小川誠司 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 山口祐子

AML1 遺伝子 (*PEBP2αB*, *CBFα2*, *RUNX1*) は、ヒトの急性骨髄性白血病 (AML) に高頻度にみられる t(8; 21)転座の切断点において、染色体 21q22 に位置する遺伝子としてクローニングされた。この t(8; 21)転座は、AML M2 のうち、約 40%の頻度で見られる。また、*AML1* 遺伝子は、種々の造血器腫瘍において高頻度に染色体転座および点突然変異の標的となり、その点突然変異に起因する家族性血小板減少症は高率に白血病を発症することから、この遺伝子異常と白血病原性との強い関連が示唆されている。

AML1 遺伝子産物は、ショウジョウバエの体節形成遺伝子の一つである *runt* 遺伝子産物およびマウスの *PEBP2α*遺伝子産物と相同な領域を有し、この部分は Runt ドメインとよばれる。*AML1* はこの Runt ドメインを介して *PEBP2* サイトとよばれる特異的な塩基配列に結合する。*AML1* の DNA に対する親和性は、Runt ドメインを介して結合する *PEBP2β* とヘテロダイマーを形成することにより著明に増加し、骨髄球の分化に関わる IL-3 や M-CSF 受容体など様々な標的遺伝子の転写を制御している。*PEBP2β* のコード遺伝子である *PEBP2β* も、AML の特異的染色体異常である inv(16)(p13;q22)からクローニングされた。*AML1* のノック

アウトマウスでは、卵黄嚢での一時造血は保存されるが胎児肝での成体型造血が完全に廃絶し胎生致死となることから、AML1 が造血の分化・増殖に重要な役割を果たしていることが考えられている。また、PEBP2 β のノックアウトマウスも AML1 と同様の表現型を示すことから、PEBP2 β が AML1 の機能発現に必要不可欠であると考えられている。AML1 には、少なくとも 4 つのアイソフォームが存在し、その内 Runt ドメインと転写活性領域の proline-, serine-および threonine-rich (PST)領域を含む AML1b が活性型フォームとして知られ、以後これを AML1 とよぶ。

近年転写因子の coactivator である p300 が AML1 と結合し、骨髄球の分化において AML1 の転写活性を促進することが報告された。一方、AML1 は corepressor である mSin3A などと結合し、転写を抑制することも知られており、結合相手により転写活性化複合体から転写抑制複合体に変化する転写調節因子の役割を果たしていると考えられる。

ヒストンのアセチル化と転写活性化の関わりは 30 年以上前から知られていたが、その分子機構は不明であった。近年、p300 と高い相同性を持つ CREB binding protein (CBP)が、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) であることが判明し、アセチル化を通して転写制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、p300/CBP がヒストン以外のタンパクである p53, GATA-1 などの転写因子をもアセチル化し、転写制御やタンパクの安定化などに深く関わっていることが示された。HAT 活性を持つ p300 と AML1 が結合することから、果たして AML1 の機能制御にアセチル化が関与しているかをみていくことにした。

まず、すでに報告されている通り、AML1 と p300 が結合することを確認するため、マウス白血病細胞株である M1 細胞を用いて解析した結果、両者が *in vivo* で結合することが確認された。

次いで、実際に AML1 がアセチル化されるかを *in vitro* のアセチル化アッセイにより検討した。アセチル化のターゲット残基はリジンであることから、AML1 に内在する 9 つのリジンを含む GST 融合タンパクを作成し (GST-AML1(1-189))、HAT 活性を持つ p300 を用いてアッセイを行った。その結果、AML1 が直接 p300 によりアセチル化されることが分かった。さらに、p300 以外の HAT である P/CAF や GCN5 ではアセチル化されず、それは p300 特異的に起こることが明らかとなった。

次に *in vivo* でのアセチル化を検証するため、ヒト急性リンパ性白血病細胞株である MOLT-4 細胞を用いて *in vivo* のアセチル化アッセイを行った。その結果、AML1 が endogenous でアセチル化されることが明らかとなった。そこで、9 つのリジンのうちいずれがアセチル化の責任残基かを検討するため、それらを網羅する 3 つの欠失変異体を用いて COS7 に強制発現させ、同様にアセチル化アッセイを行った。AML1 全長、Runt ドメイン内の 5 つ、および C 末の 2 つを欠失したものではアセチル化が確認されたが、N 末の 2 つを欠失した変異体では全くアセチル化されなかった。さらに、N 末の 2 つのリジン (K24, K43) を、いずれか一方、もしくは両者共にアルジニンもしくはアラニンに置換した変異体 (K24/43R, K24/43A) を用いて同様にアッセイを行った。その結果、両者が置換された変異体でのみ、アセチル化が完全に消失していることが確認された。*in vitro* でも同様の結果が得られた。さらに、この両者を置換した変異体でアセチル化が廃絶されたことが、変異による構造変化に起因するものでないことを証明するため、K24 および K43 が直接アセチル化されるかを GST-AML1(1-189)を用いてマスマスペクトロメトリーにて解析した。その結果、K24 を含むペプチドでのみアセチル化が確認された。K43 におけるアセチル化は確認されなかったが、これは *in vitro*, *in vivo* でのアセチル化アッセイにおいても、K43 のアセチル化の程度は K24 に比べ極めて弱いこと、また GST-AML1(1-189)が高次構造をとりアセチル化が入りにくいことを考慮すると、矛盾しない結果と考えられた。以上の結果より、AML1 のアセチル化の責任部位は N 末端に位置する K24 および K43 であることが明らかとなった。なお、この 2 つのリジンを含む部位は、DNA 結合を抑制的に制御する領域に位置している。

AML1 のアセチル化の機能制御への関わりを検討するため、ゲルシフトアッセイを用いて DNA 結合能をみた。野生型 GST-AML1(1-189)およびその変異体である GST-K24/43A(1-189)を用いて *in vitro* で DNA 結合能を比較した結果、野生型 GST-AML1(1-189)では、アセチル化により著明に DNA への親和性が増強することが分かった。しかし、GST-K24/43A(1-189)では、アセチル化の有無に関わらず、DNA 結合能は著明に減弱していた。PEBP2 β がヘテロダイマーを形成して DNA への親和性を増強することから、PEBP2 β の存在下でアッセイを行った結果、やはり同様の結果が得られた。さらに、COS7 で発現させた野生型 AML1 および K24/43R の核内抽出タンパクを用いてゲルシフトアッセイを行っ

た。PEBP2 β の存在下で明確なシフトバンドを確認したが、K24/43R では DNA 結合能の低下を認めた。以上より、アセチル化により AML1 の DNA 結合能が著明に増加することが明らかとなった。なお、アセチル化による DNA 結合の増強が PEBP2 β の親和性の変化によるものか、COS7 による強制発現の系で確認したが、K24/43 変異体は野生型と同程度に結合することが確認された。

次に、アセチル化による転写活性能をみた。ヒト子宮の頸部癌由来の細胞株である HeLa 細胞に、M-CSF 受容体のプロモーターを用いて、野生型 AML1 もしくは K24/43R および K24/43A のルシフェラーゼ活性を比較した。その結果、野生型 AML1 はモックコントロールに対して約 7 倍の活性を示し、p300 の共存によりさらなる増強を認めたが、K24/43R および K24/43A では、p300 の存在に関わらずその活性は著明に低下していた。

以前、私の研究室より、AML1 の DNA 結合能と転写活性能に一致して NIH3T3 細胞の transforming 能が誘導されることを報告した。そこで、アセチル化による生物学的活性を見るため、soft agar assay により transforming 活性を検討した。NIH3T3 に、レトロウイルスを用いて野生型 AML1 もしくは K24/43A を遺伝子導入し、それぞれのコロニー形成能を比較した。野生型 AML1 は速やかに多数のコロニーを産生したが、K24/43A における産生能は著しく減少していた。

以上の結果より、AML1 が *in vitro* で直接 p300 により特異的にアセチル化されること、その責任部位は DNA 結合を抑制的に制御する N 末端に位置する K24 および K43 であることを示した。*in vivo* においても同様の結果を得、さらにアセチル化により AML1 の DNA 結合能が著明に増加することが明らかとなった。K24 および K43 をアルジニンもしくはアラニンに置換した変異体では、DNA 結合能および転写活性能が著しく低下し、また線維芽細胞における transforming 能の低下を認めた。以上より、AML1 の転写制御において、p300 による AML1 のアセチル化が重要な役割を果たしていることが示された。