

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 山口 祐子

本研究は、ヒトの急性骨髄性白血病に高頻度にみられる t(8; 21)転座からクローニングされた *AML1* 遺伝子の転写産物である *AML1* が、翻訳後修飾の一つであるアセチル化を受けるか検討し、またその修飾が *AML1* の転写因子としての機能にどのような影響を及ぼすのか解析し、下記の結果を得ている。

1. histone acetyltransferase (HAT)活性を持つ p300 と *AML1* の結合を、マウス白血病細胞株である M1 細胞を用いて IP-Western 法により検討した結果、両者が *in vivo* で結合することが確認された。
2. *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である9つのリジンを含む GST に融合した *AML1* タンパク (GST-*AML1*(1-189)) を作成し、HAT 活性を持つ recombinant の 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示された。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示された。
3. ヒト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結果、*AML1* が endogenous でアセチル化されることが明らかとなった。次に、全てのリジン残基を網羅する 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。その結果、N 末の 2 つを欠失した変異体では全くアセチル化を認めなかった。さらに、N 末の 2 つのリジン (K24, K43) を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) でアセチル化の完全な消失を確認した。*in vitro* でも同様の結果が得られた。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結果、K24 を含むペプチドでのみアセチル化が認められた。K43 のアセチル化は検出されなかったが、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 であることが示された。

4. ゲルシフトアッセイにより AML1 のアセチル化による DNA 結合能への影響をみた。GST-AML1(1-189)およびそのアラニン変異体を用いて *in vitro* で DNA 結合能を比較した結果、GST-AML1(1-189)では、アセチル化により DNA への親和性が著明に増強した。しかし、アラニン変異体ではアセチル化の有無に関わらず、DNA 結合能は著しく減弱していた。PEBP2 $\beta$ 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 $\beta$ 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 の全長および 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結果、変異体での 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示された。
5. アセチル化による DNA 結合能の増強が PEBP2 $\beta$ の親和性の変化に起因するのか、COS7 による強制発現系で IP-Western 法により検討したが、K24/43A は野生型と同程度に結合することが示された。
6. アセチル化による転写活性を検討するため、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、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、いずれの変異体も p300 の存在に関わらずその活性は著明に低下していた。
7. 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 細胞に、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、本論文は 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 を置換した変異体では DNA 結合能および転写活性が著しく低下し、また線維芽細胞における transforming 能の低下を認めた。 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初めて示され、学位の授与に値するものと考えられる。