

様式

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所属)	(職名・学年)	(氏名)
研究者	分子生化学	助教	横田 明日美
研究の名称	AML1/Runx1の翻訳後修飾による機能制御メカニズム		
研究のキーワード	AML1、造血、リン酸化		
研究の概要	<p>胎生期における造血幹細胞の正常な発生、成体内での血球分化、また白血病発症にも関わる重要な転写因子であるAML1/Runx1は、最近、リン酸化やアセチル化、ユビキチン化などの翻訳後修飾を受けることが明らかにされてきた。これらはRunx1の転写活性調節において重要な役割を果たしているとの報告があり、注目されているものの、実際どのようにRunx1の機能に関与しているのか、またどういった分子がRunx1の翻訳後修飾に関わっているのかなど、詳細については未だ不明な点が多い。本研究において、我々は特にリン酸化修飾に焦点をおき、<u>Runx1の機能にRunx1分子のリン酸化がどのような影響を与え得るかについて、細胞レベル、分子レベルで検討すると共に、遺伝子改変マウスの作製・その表現型解析を通して個体レベルでも検討を行い、包括的視点からRunx1による造血制御の新規分子メカニズム解明を目指すことをその目的としている。</u></p> <div style="text-align: center;"> <pre> graph TD     A[サイトカインなど 細胞外微小環境からのシグナル] --&gt; B[キナーゼ活性化]     B --&gt; C[Runx1リン酸化修飾]     C --&gt; D[In vitro 細胞レベル]     C --&gt; E[In vivo マウス個体レベル]     D --- D_list["転写活性化能 DNA結合能 共役因子との親和性 タンパク安定性 細胞内局在 血球系細胞への分化"]     E --- E_list["胎生期の造血発生 成体での造血制御"]     E --- E_target["Runx1のリン酸化を促進、抑制するシグナルの解明、 リン酸化によるRunx1制御の分子メカニズム、 生体内の造血制御における役割の解明を目指す"]                     </pre> </div>		
研究の背景	<p>Runx1は、急性骨髄性白血病で高頻度に見られるt(8;21)染色体相互転座の転座切断点の分子クローニングを通じて同定された転写因子でありGM-CSF受容体、M-CSF受容体など造血に関わる重要な標的遺伝子群の転写調節に関与する。また、Runx1のこの作用がAorta, Gonads, Mesonephros</p>		

	<p>(AGM) 領域から造血幹細胞が生み出される段階で機能していることや、成体における血小板造血や胸腺T細胞の増殖制御においてもRunx1が重要な役割を果たしていることなども示されている。これらRunx1の機能がどのような細胞内外のシグナルによって制御されているのか、その機構を解明することが次の大きな課題となっている。</p> <p>一方、Runx1分子はリン酸化、アセチル化、ユビキチン化などの翻訳後修飾を受けることが分かっており、これらによりRunx1の細胞内局在、分解、転写活性化能、DNA結合能などが調節されるものと考えられている。従って、翻訳後修飾によるRunx1の機能制御は、正常造血や白血病等の疾患に関連する細胞内外からのシグナルの効果点となっている可能性が示唆されるが、その詳細については多くの不明な点が残されている。</p>
研究手法	<p>マウスRunx1分子内のリン酸化を受けるセリンもしくはスレオニン残基をアラニン（脱リン酸化状態を模倣する）またはアスパラギン酸（リン酸化状態を模倣する）に置換するようRunx1変異体を作製する。野生型Runx1またはこれら変異体を発現させた細胞株において、Runx1の転写活性能やDNA結合能、細胞増殖、細胞周期への影響について、レポーターアッセイや細胞周期解析やウェスタンブロッティング法によって解析する。並行して、Runx1欠損マウスES細胞に変異型Runx1を導入し、Runx1欠損ES細胞の<i>in vitro</i>での血球系細胞への分化障害を解除し得るかについて、造血サイトカイン添加条件下にて分化誘導培養を行い評価する。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>マウスRunx1分子内のリン酸化標的となるセリン、スレオニン残基9箇所について、全て、または1箇所ずつをアラニン、またはアスパラギン酸に置換した変異体を作製した。これらについて、転写活性化能を検討したところ、9箇所全てをアラニンに置換した変異体（9A）は野生型（WT）と比較してM-CSFRプロモーター転写活性化能は2～3倍程度高くなっており、逆にアスパラギン酸に置換した変異体（9D）はWTの半分程度に低下していた。また、1箇所ずつをアラニンまたはアスパラギン酸に置換した変異体についても同様に検討を行ったが、9Aと9Dの転写活性化能の変化はこれら9箇所による変化の相加的現象であると考えられた。</p> <p>WT、9A、9Dの蛋白レベルの解析より、変異体の転写活性化能の変化はRunx1蛋白の安定性の変化による可能性も考えられたことから、それぞれの蛋白半減期を<sup>35</sup>S-Methionine標識により詳細に検討するため準備中である。また、リン酸化状態による細胞内局在の変化によって転写活性化能が変化していることも考えられるため、WT、9A、9Dを発現させた細胞の蛍光免疫染色を行い、観察する予定である。</p> <p>9A、9Dの2つの変異体は、Runx1欠損マウスES細胞への導入を行っているところであり、造血サイトカイン添加条件下における<i>in vitro</i>での血球系統への分化誘導、ならびにマウス個体作製に進む予定である。</p>

地域への研究成果の還元状況	現時点では社会に還元できる段階には至っていないが、造血制御の詳細なメカニズムについて明らかにし、その破綻による造血器疾患についてより深い理解と共に治療法の開発に発展できるよう、今後研究成果を学会発表等を通して社会に発信し、還元することを目指している。
今後の期待	Runx1のリン酸化状態によって、造血に関与するプロモーターの転写活性化能が有意に変化することから、Runx1変異体を導入したマウスES細胞の血球系統分化誘導、またこのES細胞より作製するマウス個体の造血発生や造血制御に関する解析においても、基礎のみならず臨床医学の発展にも寄与する貴重な知見を得られることが期待される。
研究発表	研究の背景については、「横田明日美、他. 造血発生制御メカニズムの今日的理解. 京都府立医科大学雑誌、119(10); 681-693, 2010.」に記載した。