

## <はしがき>

本研究課題「MEL1S-EVI1 遺伝子群による白血病発症機構の解析」は、森下らが行ってきた20年に及ぶ EVI1 あるいは MEL1 を原因遺伝子とする難治性白血病に関する一連の研究に連なる検討であり、多くの類似点をもつ両者に共通する白血病発症機構を解明することが目的である。

1988年、森下らはマウス白血病におけるウイルス感染による白血病発症機構の解析から、白血病ウイルスのゲノム挿入により転写活性化した宿主側の遺伝子 EVI1 (Ecotropic viral integration site-1) を単離した (Morishita K *et al*, Cell, 1988) (図 1A)。その後、ヒト白血病において 3q21q26 症候群における t(3;3)(q21;q26)、あるいは inv(3)(q21;q26) 染色体転座による EVI1 の異常発現を突き止め、ヒト白血病の責任遺伝子候補であることを明らかにした (Morishita K *et al*, PNAS, 1992) (図 1B)。さらに、これと類似した症状を示す白血病が有する t(1;3)(p36;q21) 染色体転座の転座点近傍より異常発現する新規の遺伝子 MEL1 (MDS1/EVI1-like gene 1) を単離した (Mochizuki N *et al*, Blood, 2000) (図 1C)。MEL1 遺伝子は前出の EVI1 遺伝子に高い相同性をもつ Zinc finger 型転写因子であり、EVI1 とファミリーを形成していた。このファミリーではいずれの遺伝子にも、N 端に PR ドメインと呼ばれる機能未知の領域を含む・含まない 2 通りの発現が可能で、前出の白血病では PR を欠く EVI1、あるいは MEL1S(short) が主に発現していた (Nishikata I *et al*, Blood, 2003)。最近、慶応大学医学部須田らのグループとの共同研究により EVI1 欠損マウスの造血発生過程を解析を行い、EVI1 が直接 GATA-2 遺伝子の発現調節に関与し、主として二次造血において GATA-2 遺伝子の発現を亢進させ、造血幹細胞の維持と分化に関与することが明らかになった (Yuasa H *et al*, EMBO J, 2005)。

前報告 (課題番号 16590950、平成 17 年度) では、顆粒球分化能をもつ骨髄細胞で EVI1 が GATA-2 遺伝子 IS 上流 6-7kb の EVI1 結合 DNA 配列に結合して転写を抑制し G-CSF による分化誘導を阻止したことを述べたが、今回、我々は本研究課題の遺伝子群、特に MEL1 遺伝子から alternative splicing により産生され、EVI1 と同じく、PR ドメインを欠く MEL1S(short) が同じ骨髄細胞で示した分化誘導阻止について、同様な制御が存在するか否か検討した。このような異所性発現した EVI1 や MEL1S による転写制御の変化が白血病発症につながるとする共通の機構の存在を明らかにしたい。

## 研 究 組 織

研究代表者 : 西片 一 朗 (宮崎大学 医学部 助手)

研究分担者 : 森 下 和 広 (宮崎大学 医学部 教授)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合 計
平成 18 年度	1, 400, 000	0	1, 400, 000
平成 19 年度	1, 500, 000	450, 000	1, 950, 000
総 計	2, 900, 000	450, 000	3, 350, 000

## 研 究 発 表

- (1) 学会誌  
特になし.
- (2) 口頭発表  
特になし.
- (3) 出版物  
特になし.

## 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特になし.

## MEL1S-EVI1 遺伝子群による白血病発症機構の検討

染色体異常（転座や欠失等）はヒトがんにおける発癌機構に本質的な役割を演じていると考えられる（Rabbitts TH et al, *Nat*, 1994; Mitelman F et al, *Nat Gen*, 1997). 近年, 科学技術の進展に伴い, ヒト白血病の染色体異常に関するゲノム解析が進み、染色体切断点（転座点）またはその近傍から数多くの原因遺伝子候補が単離同定された。特に急性白血病ではその70%近くが転写因子であることが判明した（Look TA et al, *Science*, 1997). 転写因子の発現異常は細胞内環境を直接変化させ、血球細胞の分化増殖機構に異常をもたらすと考えられ、転写因子による遺伝子制御機構の解析が重要である。本研究課題であり、t(3;3)(21;26)あるいはinv(3)(q21q26)染色体転座をもつ急性骨髄性白血病 3q21q26症候群において、その転座点近傍に存在し顕著に活性化している zinc-finger 型転写因子 EVI1 (Ecotropic viral integration site-1) も (図1B), 同じくt(1;3)転座を有する急性骨髄性白血病(AML)細胞の転座点近傍から我々が単離した新規の zinc-finger 型転写因子である MEL1 (MDS1/EVI1-like gene 1) (図1C) も、1p36.3, 3q26と染色体上での存在が異なるにも関わらず、アミノ酸配列で64%, 2つあるDNA結合ドメイン(DBD1およびDBD2)ではそれぞれ 80%, 98%と極めて高い構造上の同一性(図2A)や機能上の同一性(図2B)が判明し、さらに各遺伝子が関連する白血病の病態上の類似性(表1)からも、両者に共通した白血病発症機構の存在を示唆する結果(Mochizuki N et al, *Blood*, 2000; Nishikata I et al, *Blood*, 2003)を我々は得ており、この発症機構の解明は重要である。また両遺伝子とも、N端領域にPRドメインを含むPRドメイン蛋白質(PRDM)ファミリーの構成員であり、PRドメイン(PR)はChromatin remodelingに関わる蛋白質間相互作用やメチル基転移酵素活性に重要とされるSETドメインのスーパーファミリーに属し、転写制御に関与するといわれており、PRドメインを有するRIZ1はがん抑制遺伝子、PRドメインを欠くEVI1遺伝子はがん遺伝子として機能することが推察されている。PRドメイン蛋白質には、alternative splicingにより、PRD+とPRD-の2種類の転写産物が発現することが知られており、RIZ遺伝子にRIZ1(PRD+)とRIZ2(PRD-), EVI1遺伝子にもMDS1/EVI1(PRD+)とEVI1(PRD-)とそれぞれ2種類が発現している。MEL1遺伝子にも2種類の転写産物が存在することがこれまでの我々の検討で判明しており、EVI1とMEL1(S), それぞれ関連した白血病ではPRD-型蛋白質が主に発現していたことから、PRドメインの有無による機能的差異と白血病化の関係を明らかにすることも重要である。さらにEVI1では一部の報告(Morishta K et al, *Oncogene*, 1995)を除き、転写抑制因子としての側面ばかりが強調されてきた(Bartholomew C et al, *Oncogene*, 1997; Lopingco MC et al, *Curr Top Molec Biol*

*iol Immunol*, 1996). その理由のひとつは、今までEVI1が実際に特異的なDNA配列に直接結合して発現活性化するような標的遺伝子の存在がほとんど知られていなかったためと考えられる。最近、我々は須田らのグループと行ったEVI1欠損マウスの造血発生の解析(Yuasa H et al, *EMBO J*, 2005) (図3)に端を発する一連の解析により、新規に標的遺伝子GATA-2を発見した。すなわち、(1)EVI1の強制発現によりGATA-2遺伝子ISエクソンからの転写を活性化したこと。(2)GATA-2 IS領域上流7kb内に複数個のEVI1結合配列を同定したこと。(3)GATA-2遺伝子ISエクソン上流6-7kbの範囲にEVI1により活性化する領域が存在すること。(4)EVI1はGATA-2遺伝子ISエクソン上流に存在するD1-bを含む領域と特異的に結合すること。(5)GATA-2転写活性化には第1DNA結合ドメイン、並びにC末端酸性アミノ酸集中領域が重要であること。(6)EVI1高発現白血病細胞において、更なるEVI1の強制発現によりGATA-2遺伝子ISエクソン上流7kbまでを含むレポーター遺伝子の発現が亢進したこと。(7)マウスおよびヒトEVI1高発現白血病細胞株では、GATA-2遺伝子の転写活性が見られたこと。(8)EVI1 siRNA導入ヒトEVI1高発現白血病細胞株 UCSD/AMLでは増殖が抑制され、GATA-2の発現が著しく低下した。またEVI1 アンチセンス導入EVI1高発現白血病細胞MOLM1でも、細胞の増殖速度が顕著に低下したこと。(9)EVI1はヒストンアセチル基転移酵素PCAF と相互作用したが、p300, CBPとは相互作用しなかったこと。(10)MEL1Sはその導入により、IL-3依存性骨髄細胞株 L-G3 に対して分化抑制能を示したこと。(11)MEL1Sを導入したL-G3骨髄細胞株ではTSA存在下でG-CSFにより誘導される細胞分化を回復し、MEL1Sによる分化抑制能に脱アセチル化が関与することが示唆されたこと。(12)MEL1S導入細胞株と同様、MEL1S AS変異体導入骨髄細胞株はG-CSF存在下で増殖を続けた。CtBPとの相互作用はMEL1Sの分化阻止能に必須ではないこと。(13)MEL1S導入により、L-G3細胞ではGATA-2遺伝子の発現が低下したことを前回報告した(課題番号16590950、平成17年度)。これらの結果から、MEL1SはHDACとの相互作用によりGATA-2の転写を抑制して分化阻止能に関係することが示唆されたことから、GATA-2遺伝子に対するMEL1Sの転写抑制能について検討したので報告する。

HSV-TK プロモーターには、EVI1-MEL1S 応答 DNA 配列が存在する。

これまでの検討結果に基づき、MEL1Sの転写抑制因子としての性能を評価するため、Dual-Luciferase reporter assay system (Promega)を用いて検討した。Promega社のベクター情報(図3A)に基づき、最新の内部標準ベクター pGL4.74[hRluc/tk] に つ い て TF SEACH

(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) で調べたところ、HSV-TK プロモーター内に EVI1 応答配列が存在する(図 3B)ことが判明した。EVI1 と MEL1S は、構造的・機能的に酷似しており、その認識配列(GACAAGATA, D1-CONS タイプ, 図 3C)も事実上同一である(Nishikata I. et al, *Blood*, 2003)ことから、TF SEACH で TATA BOX 程度しか含まない(図 3E)pGL4.23 [*Iuc2/MP*]の MP (Minimal promoter) (図 3D)と In-fusion cloning kit (Clontech)を用いて交換して、pGL4 RL-MP (図 3F)を作製した。

MEL1S は、Gata2 IS プロモーター特異的に転写を抑制した。

試作した pGL4 RL-MP を実際評価した。pGL4.23 FL-MP に対して、代表的な、既存の内部標準ベクター 2 種(pGL3 RL-TK・pGL4.74 RL-TK)とともに、これらの内部標準ベクターについて、エフェクター 3 種(空ベクター・MEL1S・ $\beta$ -actin)の影響をみた。その結果、MEL1S は HSV-TK プロモーター配列を有する内部標準ベクターに対して作用し、空ベクターの 1/10-1/20 と、その発現を劇的に低下させた(図 4A)。このため、pGL4.23 FL-MP に応答配列が何もないにも関わらず、MEL1S の影響は、見かけ上、pGL4.74 RL-TK で 3 倍を超え、pGL3 RL-TK では 2 倍程度だが、 $\beta$ -actin の発現ですら影響が出た(図 4C)。また理由はよくわからないが、間接的に pGL4.23 FL-MP でのホタルルシフェラーゼの発現にも影響を与えた(図 4B)。いずれにしても、pGL4.23 FL-MP/ pGL4 RL-MP の組み合わせの場合、エフェクター 3 種(空ベクター・MEL1S・ $\beta$ -actin)の影響が最も少なかったことから、以後の検討はこれを用いて Dual-Luciferase reporter assay system を行うこととした。

GATA-2 遺伝子 IS エクソン上流 0-7 kb の範囲を応答配列としたところ、MEL1S によりレポーターの発現が抑制された。

pGL4.23FL-MP には、EVI1 に倣って(Yuasa H et al, *EMBO J*, 2005)、GATA-2 遺伝子 IS エクソン上流域から、6-7kb と 0-7kb の範囲を応答配列として組み込んだ(図 5A)。pGL4 FL-MP (空ベクター)、pGL4 FL-MP67K, pGL4 FL-MP7.0 の 3 種を 293T 細胞で発現させたところ、MEL1、MEL1S とともに、Gata2 IS プロモーター特異的に転写を抑制した。すなわち、空ベクターに対して、30%程度の抑制であった(図 5B)。MEL1S の転写制御については、(1)マウス teratocarcinoma P19 細胞で発現させた場合、D2-CONS 特異的に転写を活性化したこと。(2)GAL4 システム

で GAL4 DBD との融合蛋白質として発現させると、MEL1, MEL1S とも転写を抑制したことを以前報告した(Nishikata I. et al, *Blood*, 2003).

L-G3 細胞を用いた場合、MEL1S はレポーターの発現を劇的に低下させた。

MEL1S の転写抑制効果を評価するに相応しい細胞を探索するため、pGL4.23 FL-MP/ pGL4 RL-MP の組み合わせで Dual-Luciferase reporter assay system を行うこととした。293T は MEL1、MEL1S ともに 30%程度の抑制であった(図 6A)が、今回 60%近い抑制効果を示した HeLa を除き、COS7 や CHO もほぼ同程度であった。これに対して IL3 依存性マウス骨髄細胞株 L-G3 の場合、MEL1, MEL1S, 非 CtBP 結合型 MEL1S 変異体 AS, それぞれに、90%, 80%, 60%の抑制効果を示した。このような抑制効果は、L-G3 の安定発現株にも反映していた。すなわち、未導入の Parental L-G3 や空ベクター導入の L-G3/NEO では、MEL1S の一過性導入により、初めて抑制効果が認められるのに対して、それぞれ安定発現株となった、L-G3/MEL1, L-G3/MEL1S, L-G3/AS では、レポーターとしてのホタルルシフェラーゼの発現を捕らえることがほとんどできないくらい抑制していた。

MEL1S によるレポーターの発現抑制には 2つの CtBP 結合モチーフを含む領域が必要であり、特に MEL1S の転写制御に重要とされるアセチル化の標的 K599 が深く関わっている。

MEL1S のドメイン欠失変異体を作製した(図 7A)。すなわち、(1)ZnF1-7 を含む DBD1 ドメイン(40-263aa) (2)Proline Rich Region を含む領域(264-523aa) (3)CtBP-Binding Motif を含む領域 (524-643aa)(4)Repression Domain(644-765aa) (5)ZnF8-10 を含む DBD2 ドメイン(766-886aa) (6)酸性アミノ酸集中領域を含む C 末端領域(892-1072aa)の 6つの欠失変異体を Wild-type とともに、L-G3 細胞で一過性発現させ、構築したホタルルシフェラーゼ・レポーターベクターで、欠失に伴う抑制度の減弱から、各ドメインの重要度を査定した。その結果、MEL1S の転写抑制には CBM を含む領域が最も重要であり、これに PRR を含む領域が続き、わずかに DBD1 も関係することが判明した(図 7B)。さらに CBM を含む領域にあるいくつかのアミノ酸残基について、点変異体を作製して、同じくレポーターアッセイで比較したところ、2つの CtBP 結合モチーフに挟まれた 4つの K (Lys)のうち、599 番の K のアラニン(A)置換が抑制活性に強く影響した。なお、付近のアミノ酸配列は、EVI1 との間でよく保存されてお

り、EVI1 の転写活性化でアセチル化の標的となるのはこのK599 であることが興味深い。

L-G3細胞で安定発現させたMEL1S は核内に存在し、一部はアセチル化されている。

LG3細胞で安定発現させたFLAGタグ付きMEL1, MEL1S, ASについて、ウサギFLAG抗体-FITC 標識抗ウサギ IgG で反応させ、DAPI 染色(核)およびPhalloidin-Alexa546 染色(細胞質)のパターンと蛍光顕微鏡下に比較したところ、核-細胞質の分配率にやや違いを認めたものの、核および細胞質のいずれにも分布していた(図 9A-9D)。また細胞膜直下に集積するものが一部に認められた。今後、共焦点レーザー顕微鏡を用いた、より詳細な解析を行う必要がある。さらに MEL1S および AS の細胞内局在を明らかにするため、これらを安定発現させたL-G3細胞について、Novagen社製 NucBuster Protein Extraction Kitを用いた核-細胞質分画を行い、特異抗体でWestern Blot 解析した。その結果、いずれも核に安定に存在し(図 8A)、少なくとも、その一部はアセチル化されていた(図 8B)。さらにトリコスタチンA (TSA)処理により、細胞質にも存在が示されたが、蛋白量が増加していることもその一因かもしれない。

G9A は MEL1S を産生する骨髄系白血病細胞にも発現している。

Histone methyltransferase G9A (EHMT2) は、MEL1S を産生するヒト骨髄系白血病細胞でも、分化誘導実験に供したマウス L-G3 細胞株、すなわち、Parental L-G3, L-G3 NEO (MOCK), L-G3/MEL1, L-G3/MEL1S, L-G3/AS のすべてで、RT-PCR 法により、その発現が確認された。さらにそのメチル化転移活性に必須とされ、ヘテロダイマーを構成するパートナー、GLP (EHMT1)の存在も確認された。

MEL1S は G9A と相互作用する。この相互作用を CtBP が安定化する。

FLAGタグ付きMEL1S と Hisタグ付きG9A を HEK293T 細胞に共発現させ、FLAG抗体レジン、または Ni-レジンを用いて回収、相互作用の有無を Western blot 解析した。その結果、ME1S がヒストンメチル化酵素 G9A と相互作用することが判明した。さらに、共発現の際、FLAGタグ付き CtBP1 または FLAGタグ付き CtBP2

も共存させたところ、Ni レジンからの MEL1S の回収量が増加したことから、CtBP1/2 の存在下に MEL1S と G9A の相互作用は安定化することが示唆された。

## ま と め

各種白血病細胞を用いて EVI1, 並びに MEL1S(short; PRD-)による GATA-2 遺伝子の発現調節と白血病発症機構との関係を検討してきた。EML-C1 や HEL において EVI1 発現に伴う GATA-2 遺伝子 IS エクソンからの転写促進、逆に L-G3 においては同領域に転写抑制が見られた。EML-C1, HEL における転写は GATA-2 IS 領域上流 6-7kb に存在する EVI1 結合 DNA 配列に直接結合することにより活性化した。この活性化には EVI1 とヒストンアセチル化酵素 PCAF との相互作用、EVI1 のアセチル化が関与することが示唆された。逆に、L-G3 では同じ領域に EVI1 (MEL1S) が結合することで転写が抑制された。L-G3 における EVI1 (MEL1S) 遺伝子の発現は G-CSF による細胞分化抑制能を持つ。この細胞分化抑制能は TSA の添加により回復するため、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC の関与による EVI1 (MEL1S) 遺伝子の転写抑制が関係している。同様の結果を MEL1S から得ており、MEL1S 高発現白血病細胞にも MEL1S に依存した GATA-2 の発現調節機構の存在が想定されるが、(1)非 CtBP 結合型 MEL1S 変異体 AS で Wild-type と同様に分化誘導阻止が起こること(ただし、Wild-type のように TSA 処理で分化誘導がレスキューされるかどうかは不明のまま) (2)分化誘導阻止活性がない MEL1 と比較しても、AS の GATA-2 IS プロモーター特異的な転写抑制活性は著しく低調であること(ただし、分化誘導阻止活性と GATA-2 IS プロモーター特異的な転写抑制活性が対応するものかどうかは不明のまま) (3)G9A との相互作用に CtBP が必要であり AS には不都合であること(ただし、PCAF を co-activator といいながら、G9A を co-repressor といっているかどうかは不明のまま)など、この変異体から得られた情報に関して、再検証の必要性を感じる。以上、白血病細胞における EVI1/MEL1S に依存した GATA-2 の発現調節に違いが見られたことから、EVI1/MEL1S の異所性発現による転写制御の変化が白血病発症につながることを示唆された。

## 今 後 の 展 開

MEL1S は HDAC との相互作用により GATA-2 の転写を抑制して 分化阻止能に関与することが示唆されたことから、今後とも白血病発症機構の一環として、転写



抑制の検討を継続する予定である。我々は今まで白血病の責任遺伝子として、MEL1 を捉えてきたが、最近、全く異なるジャンルで注目されていることがわかった。すなわち、メタボリック症候群などで注目されている脂肪代謝の研究では、褐色脂肪細胞関連遺伝子の発現と維持に MEL1 (PRDM16) が必須であるとの報告がなされた (Seale, P. et al., *Cell Metabo.*, 2007; Kajimura, S. et al, *Gene Dev.*, 2008). すなわち、褐色脂肪細胞には、脂肪蓄積に関係が深い白色脂肪細胞特異的遺伝子群と同じく脂肪燃焼に関係する褐色脂肪細胞特異的遺伝子群が共存するものの、前群は MEL1 と CtBP の協奏作用で抑制され、同時に後群には既知の制御因子 PGC-1 が CtBP と入れ替わり MEL1 とともに活性化に働くとする機構が示唆された。MEL1S を責任遺伝子とする白血病発症機構を想定する場合も、同じように、MEL1S により転写発現を活性化される遺伝子と抑制される遺伝子が同時に存在することが考えられる。例えば GATA-2 遺伝子は転写活性化され、未分化性を維持し、増殖に正に関与する一方、未同定のX遺伝子の転写を抑制して分化阻止能を発揮するという関係も考えられることから、EVI1 とともに、転写制御機構の検討を継続したいと考えている。

## 参 考 文 献

1. Morishita, K., Parker, D.S., Mucenski, M.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Ihle, J.N. : Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell*. 54:831-840 (1988).
2. Morishita, K., Parganas, E., William, C.L., Whittaker, M.H., Drabkin, H., Oval, J., Taetle, R., Valentine, M.B., Ihle, J.N. : Activation of EVI1 gene expression in human acute myelogenous leukemias by translocations spanning 300-400 kilobases on chromosome band 3q26. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:3937-3941 (1992).
3. Mochizuki, N., Shimizu, S., Nagasawa, T., Tanaka, T., Taniwaki, M., Yokota, J., Morishita, K. : A novel gene *MEL1*, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the *MDS1/EVI1* gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood*. 96:3209-3214 (2000).
4. Nishikata, I., Sasaki, H., Iga, M., Tateno, Y., Imayoshi, S., Asou, N., Nakamura, T., Morishita, K. : A novel *EVI1* gene family, *MEL1*, lacking a PR domain (*MEL1S*) is expressed mainly in t(1;3)(p36;q21)-positive AML and blocks G-CSF-induced myeloid

- differentiation. *Blood*. 102:3323-3332 (2003).
5. Yuasa, H., Oike, Y., Iwama, A., Nishikata, I., Sugiyama, D., Perkins, A., Mucenski, M., Suda, T., Morishita, K. : Oncogenic transcription factor *Evi1* regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression. *EMBO. J.* 24:1976-1987 (2005).
  6. Rabbitts, T.H. : Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*. 372:143-149 (1994).
  7. Mitelman, F., Mertens, F., Johansson, B. : A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Genet.* 15(Spec.No.):417-474 (1997).
  8. Look, A.T. : Oncogenic transcription factors in human acute leukemias. *Science*. 278:1059-1064 (1997).
  9. Morishita, K., Suzukawa, K., Taki, T., Ihle, J.N., Yokota, J. : Evi-1 zinc finger protein works as a transcriptional activator and via binding to a consensus sequence of GACAAGATAAGATAN<sub>1-28</sub>CTCATCTTC. *Oncogene*. 10:1961-1967 (1995).
  10. Bartholomew, C., Kilbey, A., Clark, A.M., Walker, M. : The Evi-1 proto-oncogene encodes a transcriptional repressor activity associated with transformation. *Oncogene*. 14:569-577 (1997).
  11. Lopingco, M.C., Perkins, A.S. : Molecular analysis of Evi1, a zinc finger oncogene involved in myeloid leukemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 211:211-222 (1996).
  12. Delwel, R., Funabiki, T., Kreider, B.L., Morishita, K., Ihle, J.N. : Four of the seven zinc fingers of the Evi-1 myeloid-transforming gene are required for sequence-specific binding to GA(C/T)AAGA(T/C)AAGATAA. *Mol. Cell Biol.* 13:4291-4300 (1993).
  13. Funabiki, T., Kreider, B.L., Ihle, J.N. : The carboxyl domain of zinc fingers of the Evi-1 myeloid transforming gene binds a consensus sequence of GAAGATGAG. *Oncogene*. 9:1575-1581 (1994).
  14. Minegishi, N., Ohta J., Yamagiwa, H., Suzuki, N., Kawauchi, S., Zhou, Y., Takahashi, S., Hayashi, N., Engel J.D., Yamamoto M. : The mouse *GATA-2* gene is expressed in the

Para-Aortic Splanchnopleura and Aorta-Gonados and Mesonephros region. *Blood*. 93:4196-4207 (1999).

15. Ohyashiki, H.J., Ohyashiki, K., Shimamoto, T., Kawakubo, K., Fujimura, T., Nakazawa, S., Toyama, K. : Ecotropic virus integration site-1 gene preferentially expressed in post-myelodysplasia acute myeloid leukemia: possible association with GATA-1, GATA-2, and stem cell leukemia gene expression. *Blood*. 85:3713-3718 (1995).
16. Morishita, K., Parganas, E., Matugi, T., Ihle, J.N. : Expression of the Evi-1 zinc finger gene in 32Dc13 myeloid cells blocks granulocytic differentiation in response to granulocyte colony-stimulating factor. *Mol. Cell Biol*. 12:183-189 (1992).
17. Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavemier, G., Langin, D., Spiegelman, B. M. : Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metabo*. 6:38-54 (2007).
18. Farmer, S. R. : Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. *Gene Dev*. 22:1269-1275 (2008).
19. Kajimura, S., Seale, P., Tomaru, T., Erdjument-Bromage, H., Cooper, M. P., Ruas, J. L., Chin, S., Tempst, P., Lazar, M. A., Spiegelman, B. M. : Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Gene Dev*. 22:1397-1409 (2008).

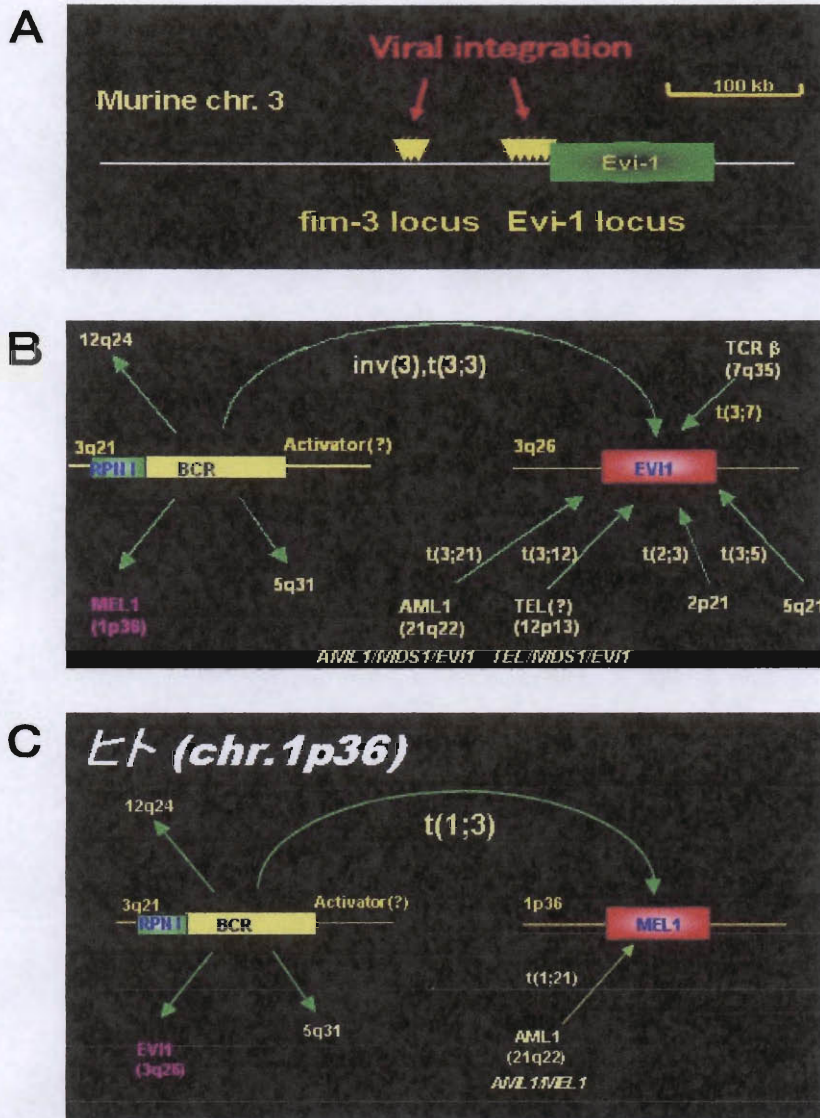


図1 EVI1とMEL1は白血病の責任遺伝子である。

- A : マウスEvi-1 (Ecotropic viral integration site-1), マウス白血病ウイルス感染由来骨髄性白血病の原因遺伝子. ウイルスの挿入により活性化する宿主側因子. (Morishita et al Cell, 1988)
- B : ヒトEVI1, Evi-1ヒト型ホモログ. Chr3q26に染色体異常を有する骨髄性白血病の原因遺伝子. (Morishita et al, PNAS, 1992)
- C : ヒトMEL1 (MDS1/EVI1-like gene 1), 1p36に染色体異常を有する骨髄性白血病の原因遺伝子. (Mochizuki et al, Blood, 2000; Sakai et al, Genes Chromosomes Cancer, 2005)

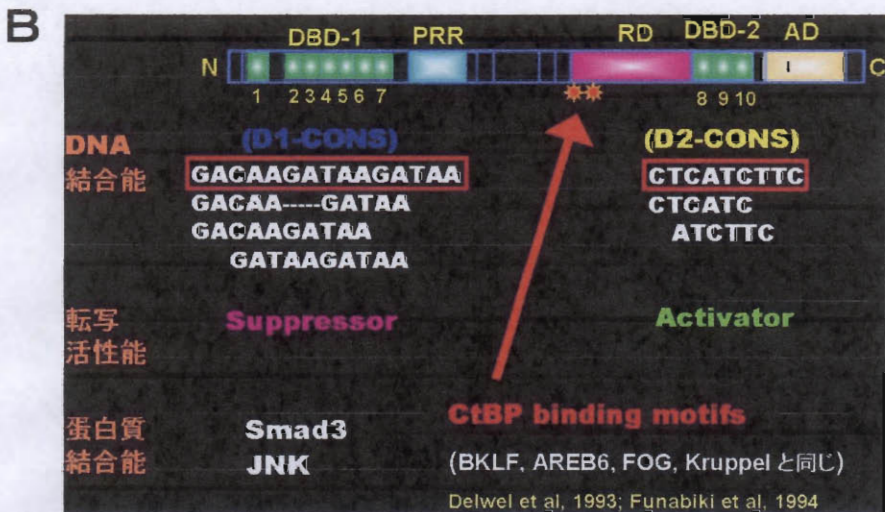
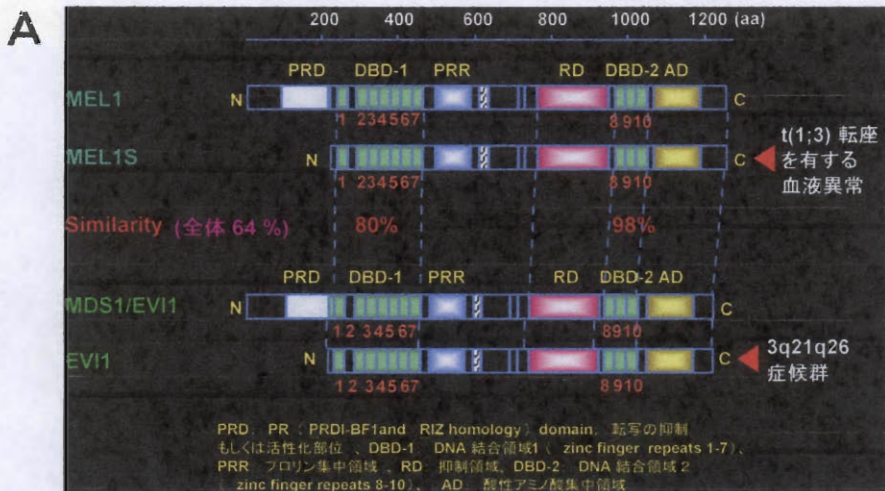


図2 EVI1とMEL1は同じ転写因子群のメンバーである。

A: EVI1とMEL1, その遺伝子産物のドメイン構造は酷似している。

B: EVI1とMEL1, 転写因子としての機能は極めてよく似している。

臨床病態	3q21q26症候群	t(1;3)転座を有する血液異常
責任遺伝子	EVI1	MEL1S
染色体異常	t(3;3)(q21;q26) inv(3)(q21q26) ins(3)(q21;q26) 7番染色体欠失	t(1;3)(p36;q21) 5番染色体欠失
病型	骨髄異形成症候群での発症が多い 急性骨髄性白血病(M0-7)に移行	骨髄異形成症候群での発症が多い 急性骨髄性白血病(M1, M4)に移行
造血系異常	巨核芽球形態異常 血小板増多	巨核芽球形態異常 血小板増多
経過	化学療法に不反応性 短期間に死亡	化学療法に不反応性 短期間に死亡
頻度	3~5%	1%以下

表1 EVI、並びにMEL1が関係する白血病.

t(1;3)転座を有する急性骨髄性白血病はEVI 1を高発現している3q21q26症候群と似ている. t(1;3)転座白血病ではEVI1のようにPRドメインを欠くMEL1S(short)が主に発現している.

A

## HSV-TK Promoter 配列

**pGL4.74[hRluc/TK] Vector**

This vector can be obtained from Promega Corporation, Madison, WI. Call one of the following numbers for order or technical information.

Order or Technical 1-800-356-9526  
Outside U.S. 608-274-4330

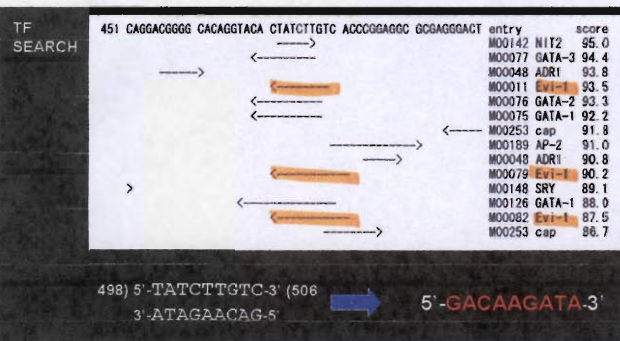
pGL4.74[hRluc/TK] Vector sequence reference points:

Base pairs	4237
HSV-TK promoter	27-779
hRluc reporter gene	815-1750
SV40 late poly(A) region	1794-2005
Reporter Vector primer 4 (RVprimer4) binding region	2071-2090
CofEI-derived plasmid replication origin	2330
Synthetic beta-lactamase (Amp <sup>r</sup> ) coding region	3119-3979
Synthetic poly(A) signal/transcriptional pause region	4084-4237
Reporter Vector primer 3 (RVprimer3) binding region	4186-4205

```

1  GGCCCTAACTG GCGGTACCT GAGTCTAAAT GAGTCTTGG ACCTCGCGG
51  GCGCGCTTAA GCGGTGTTA GGGTTTGTCT GACGCGGGG GAGGGGGAAG
101 GAAAGAAACA CTCTCATTG GAGGCGGCTC GGGGTTTGG CTTGGTGGCC
151 ACGGGCACGC AGAAGAGCGC CGGGATCCTC TTAAGCACCC CCCCGCCCTC
201 GGTGGAGGCG GGGGTTTGG CGGCGGTGG TAACTGGCG GCGGCTGACT
251 CCGGCGGCTC GCGGCGCCA GAGTGTGACC TTTTGGTCT GCTCGCAGAC
301 CCCCAGGCGG GCGGCGGCG GCGGCGAGG GCTCGCTGG TCCTAGGCTC
351 CATGGGGACC GTATAGGTG ACAGGCTCTG GAGCATCCG ACGACTGCG
401 TGATATTACC GGAGACCTC TCGGGGACCA CCGGGCTAC GCGGCTGAC
451 CCGAGCGTCC GTTGGGCGAC AAACACCAGG ACGGGGCACA GGTACACTAT
501 CTTGTACCC GGAGGCGCA GGGACTGAC GAGCTTCAG GAGTGGGCA
551 GCTGCTTCAT CCCCCTGGC CGTTGCTGC GTTGTCTGG GGTGCCCCG
601 GAAGAAATAT ATTTGATGT CTTTAGTTCT ATGATGACAC AAACCCGCG
651 CAGGCTCTG TCATTGGCA ATCGAACAC GCAGATGAC TCGGGCGCG
701 GGGTCCGAG GTCCACTTC CATATTAAG TGACGCGTG GGCCTCGAA
751 ACCGAGGAC CCGCAGCGA CCGCCTTAA AGCTTGGCA TCCGGTACTG
    
```

B



C

**Table 1. Consensus DNA binding sequences for MEL1-DNA binding domain 1**

Clones	Sequences
1-1	ATTATA GATAA GACAA GACAA
1-2c	ACGTCATAAGGGGTTTCATTAGA GATAA GATAC GGGGT
1-3	ATATCCCTCAA GATAA GATAT GATCTATAGTTTTCC
1-4	TAACAA GATAA GATAG TGGCCAGGCGAAGAACTAA
1-5b	TCACCTCAGGTA GATAA GATAA CCGACATGGTCCG
1-6	TAGATAACATCAATTTAAA GATAA GATAA AATCAC
1-7c	AACCAACCAAGACT GATAA GACTA GATAAATTA
1-8	TGAGGGCCGTAACCTGATGTATA GACAA GATAA GGGGT
1-10c	AACCAAGGCACTAA GATAT GATAA GATAACTAT
1-11c	CACCAATTAACATAAT GACAA GATAA GGGGAT
1-12	CTGAA GATAA GATAG CAACATTTCCGTTATCTCAT
1-13	CAGAGTA GATAA GATAT GATAACTAGCTCCGTGG
1-14	GACAT GATAG GATAG CATGATCTGTCATTGTGGT
1-15	TCACTA GATAA GATAA GTGGGTGGTCTGTOACATA
1-20c	CCGACA GATAA GATTA ATCTATTGTATTAAGAA
1-21	AAACCATTCACCAATA GATAA GATAA AACCAATA
1-23c	GACTATAATTTA GATAA GATCG GATAACACAAAAGA
1-27c	ACAAAAT GATAA GATAA ATCAACACCTACAAT
1-28c	ATCTCCCTTATGACTGA GACAA GATAA ATGATCAG
1-30	AAGA GATAA GATTA GATAAACAACCGGCTGATAG
1-35c	AAGAACACTA GACAA GATAT TGAGACCAATGAT
1-52	GATAA GATAA GATACTTTATCACCGATCTCCGATTTG
1-58	TCAATGA GATAA GATAT GACTGTGATGGTGGATG
1-37	ACTA GATAA GATAG GGTATGAGGATATTAGCCGT
1-40	TAAC GATAA GATAA GATAACAGGCTGACGCTTAC
1-44c	AGAATATAATGA GATAA GATAT GATAACTAATC
1-45	CTA GATAA GATAA TTCTAGACAGTGTTCGATTA
1-46	TGGATCCTAAGATTCCCTOTA GATAA GATAA TTCTACTGAAATGACTTATCATTTG
1-47c	TATCTATATAGTAACTA GATAA GATAA TTTACT
1-51	TCCGGATTAAAAAGACACACA GATAA GATAG TCGGG

G	5	1	30	0	0	0	1	30	0	0	0	6	14	5	7
A	9	24	0	30	0	30	20	0	30	0	26	18	7	16	4
T	11	5	0	0	26	0	1	0	0	28	3	5	6	7	12
C	4	0	0	0	4	0	0	0	0	2	1	1	3	2	7

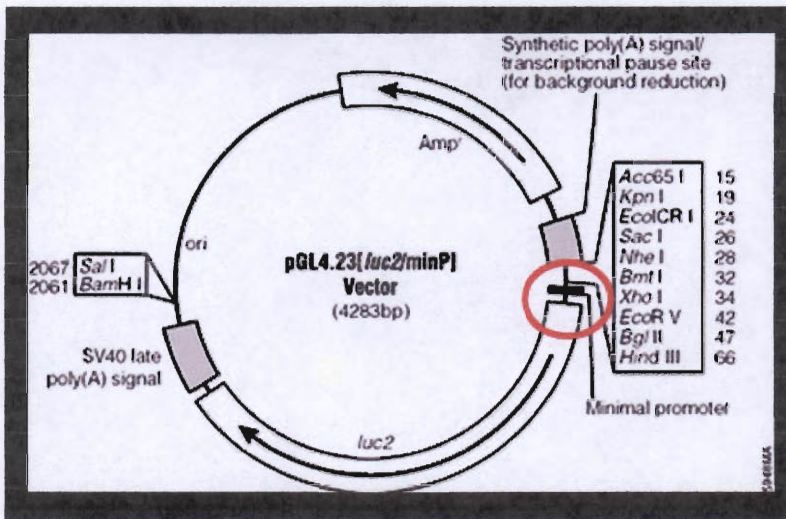
N A G A T A A G A T A A G A A G A A

(Nishikata et al. 2003)

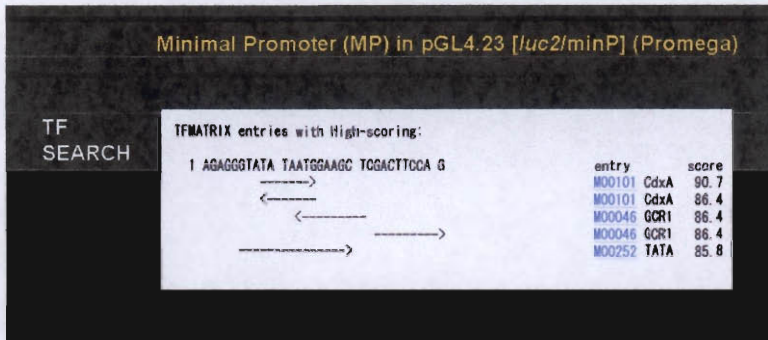
図3 TKプロモーター中にはMEL1結合配列候補が存在する。

- A : 内部標準PGL4.74 [hRluc/tk] (Promega) のプロモーターはHSV-TKである。
- B : TFサーチの結果, MEL1/EVI1 共通認識配列を発見した。
- C : TKプロモーター中のMEL1認識配列はD1タイプである。

D



E



F

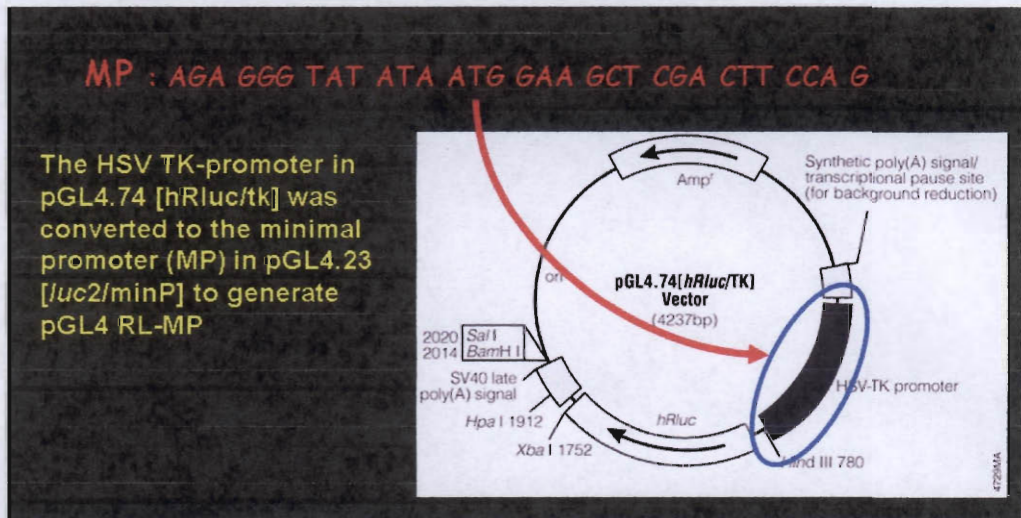


図3 TK プロモーター中にはMELIS結合配列候補が存在する (続き)。

D : pGL4. 23 [luc2/MP] (Promega)のプロモーターはMPである。

E : TF サーチの結果, TATA配列を除き特別な配列のない23塩基であった。

F : pGL4. 74のTK-promoterを除き, pGL4. 23のMP-promoterに交換, pGL4 RL-MPを構築した。



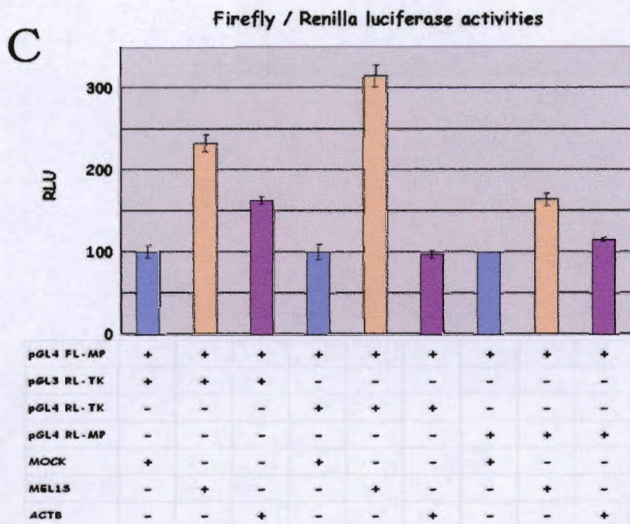
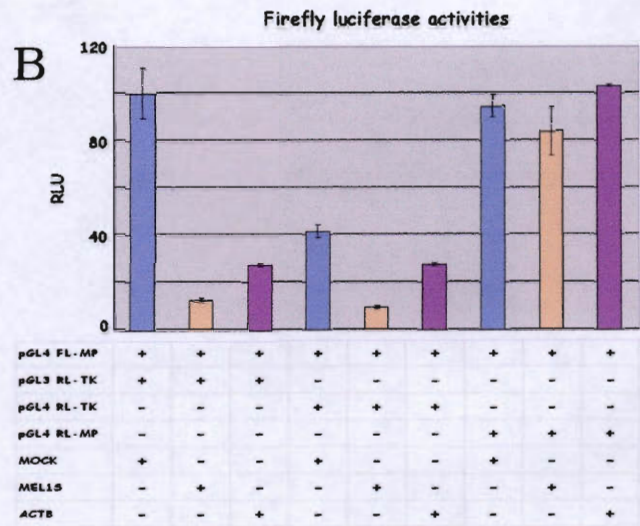
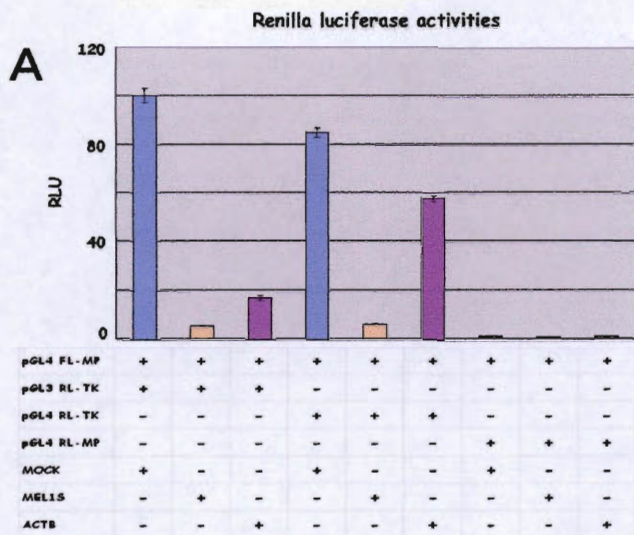
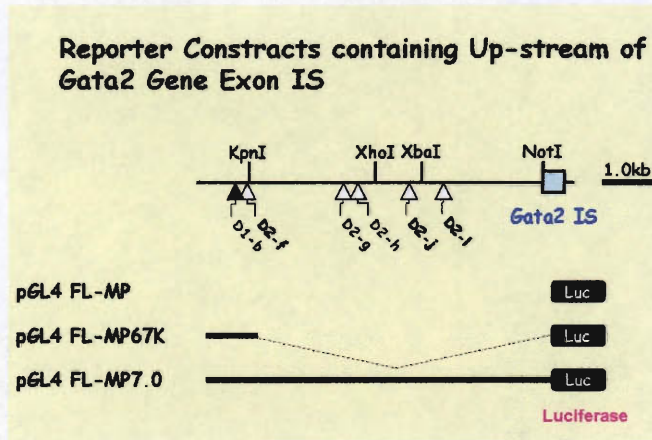


図4 TKプロモーターを有する内部標準の場合、MEL1Sはレニラルシフェラーゼの発現を劇的に抑制した。

- A : pGL4 RL-MPを内部標準とする場合、MEL1Sはレニラルシフェラーゼの発現に影響を与えなかった。
- B : ホタルシフェラーゼの発現について、応答配列を含まない空ベクターpGL4 FL-MPへの影響はなかった。
- C : 内部標準による補正後の結果について、pGL4 FL-MP/pGL4 RL-MPのセットを用いた測定系はMEL1Sの影響をもっとも受けていなかった。測定には293T細胞を使用した。

A



B

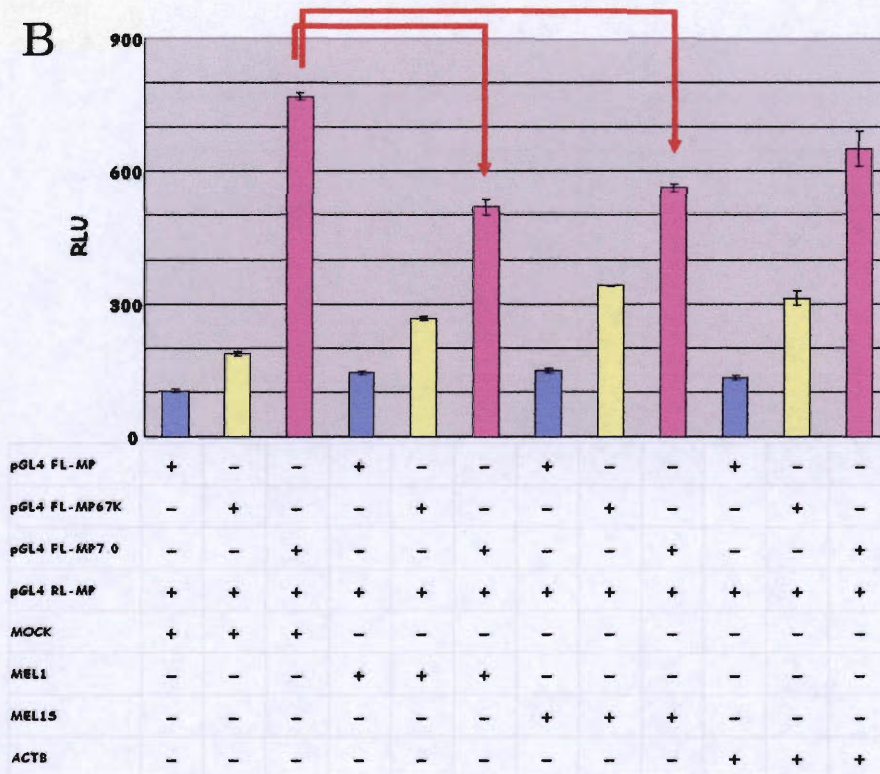


図5 応答配列としてGATA-2IS上流7kpまでを組み込んだレポーターを用いたところ、MEL1Sはその発現を抑制した。

A : 応答配列としてGATA-2IS上流域を組み込んだホタルシフェラーゼレポーターの構築 pGL4 RL-MP : pGL4.23 (Promega).

B : MEL1, MEL1Sとも、293T細胞で、Gata2 ISプロモーター特異的に転写を抑制した。内部標準はpGL4 RL-MP。

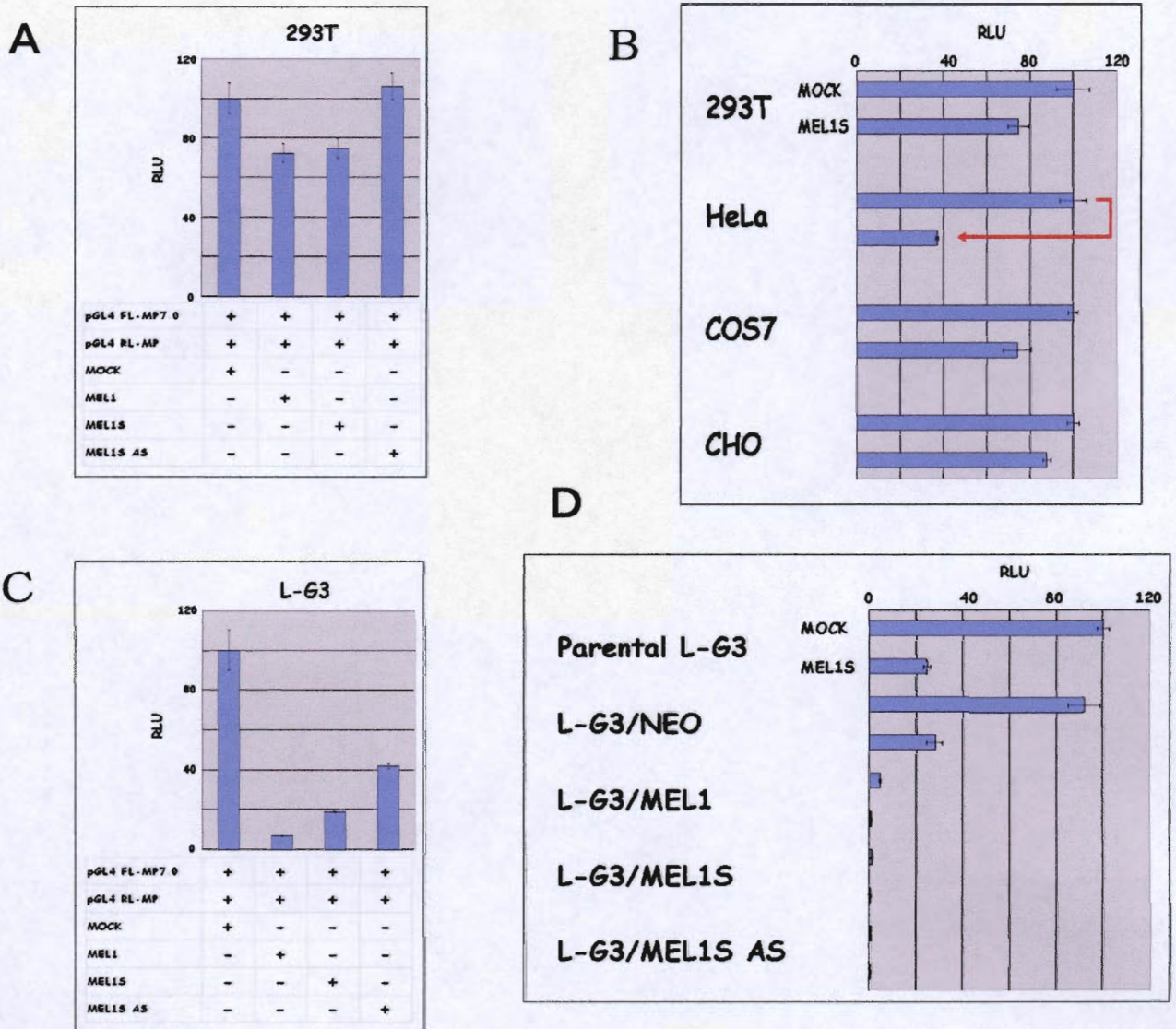
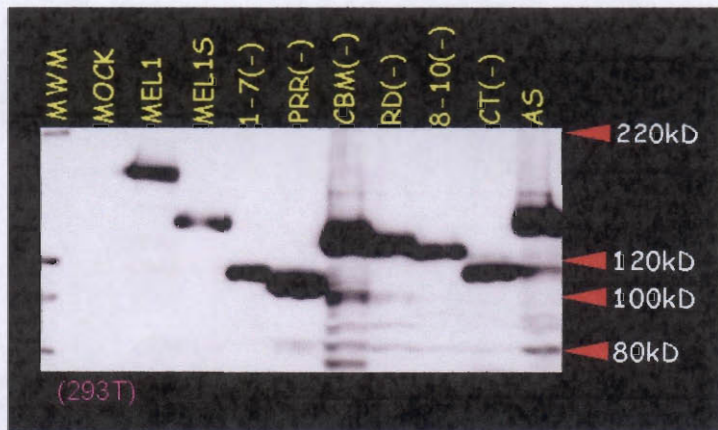


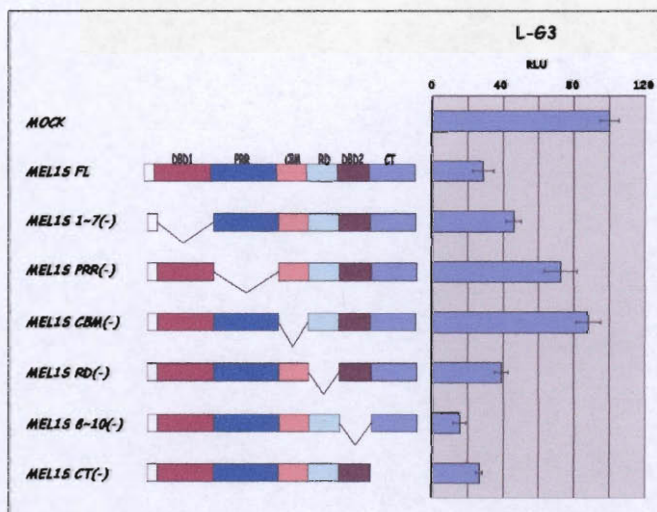
図6 IL3依存性マウス骨髄細胞株L-G3を用いた場合、MEL1Sはレポーターの発現を劇的に抑制した。

- A : ヒト胎児性腎細胞 293T細胞では、MEL1, MEL1Sとも、30%程度の転写抑制を示した。内部標準はpGL4 RL-MP。
- B : ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞で60%の抑制を示したが、293T, COS7, CHOなどの接着系細胞では10-30%の抑制に留まった。
- C : L-G3細胞の場合、MEL1Sで80%, 同非CtBP結合型変異体ASでも60%近い抑制を示した。さらにMEL1では90%を超える抑制を認めた。
- D : L-G3にMEL1, MEL1S, ASを安定発現させた細胞群では、MEL1Sを一過性発現させることなく、レポーターの発現がほぼ完全に阻止された。

A



B



C

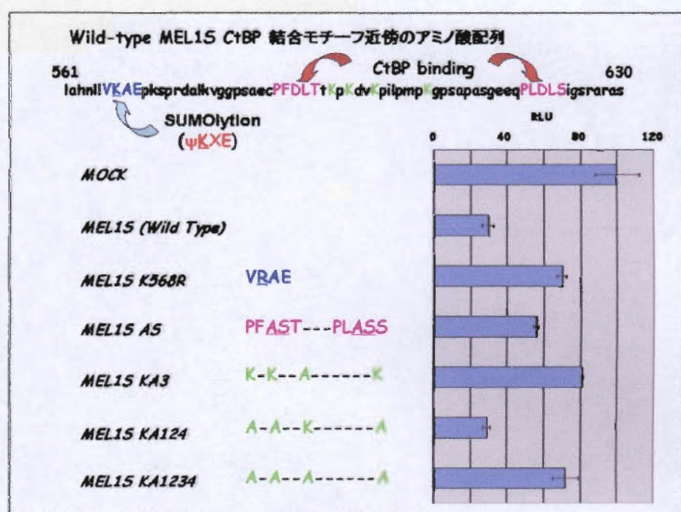
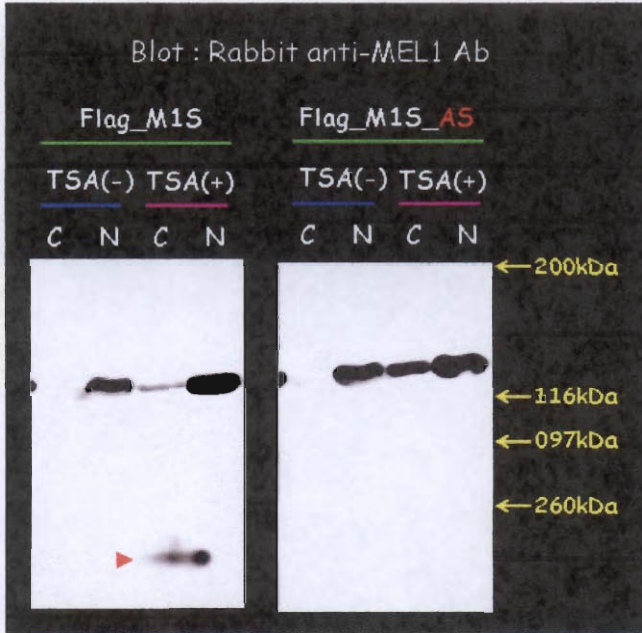


図7 レポーターの発現抑制には2つのCtBP結合モチーフを含む領域が必要であり、特に、アセチル化の標的されるK599が深く関係している。

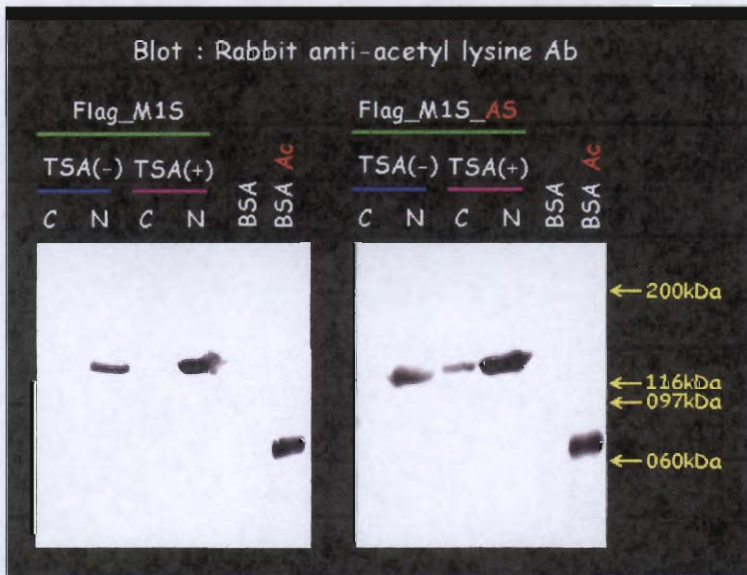
- A : MEL15およびドメイン欠失変異体の発現はFLAG抗体で確認した。細胞は293T。
- B : CtBP結合モチーフを含む領域を欠失させたMEL15変異体では、転写抑制の効果がほとんど無くなった。内部標準はpGL4 RL-MP。細胞はL-G3。
- C : 2つのCtBP結合モチーフに挟まれた4つのK (Lys)のうち、599番のKのアラニン置換が阻害活性に強く影響した。

A



TSA (+) :  
400 $\mu$ M TSA存在下  
16hr細胞培養後,  
回収.

B



C : 細胞質分  
N : 核分画

図8 L-G3細胞の場合、MEL1Sはおもに核内に存在し、少なくとも一部はアセチル化している。

- A : MEL1Sを安定発現するL-G3細胞から、細胞質-核分画を行い、MEL1抗体でみた。MEL1Sはおもに核に存在し、TSA処理により蛋白量が増加すると細胞質でも検出された。
- B : 核から抽出されたMEL1Sはアセチル化抗体に反応した。

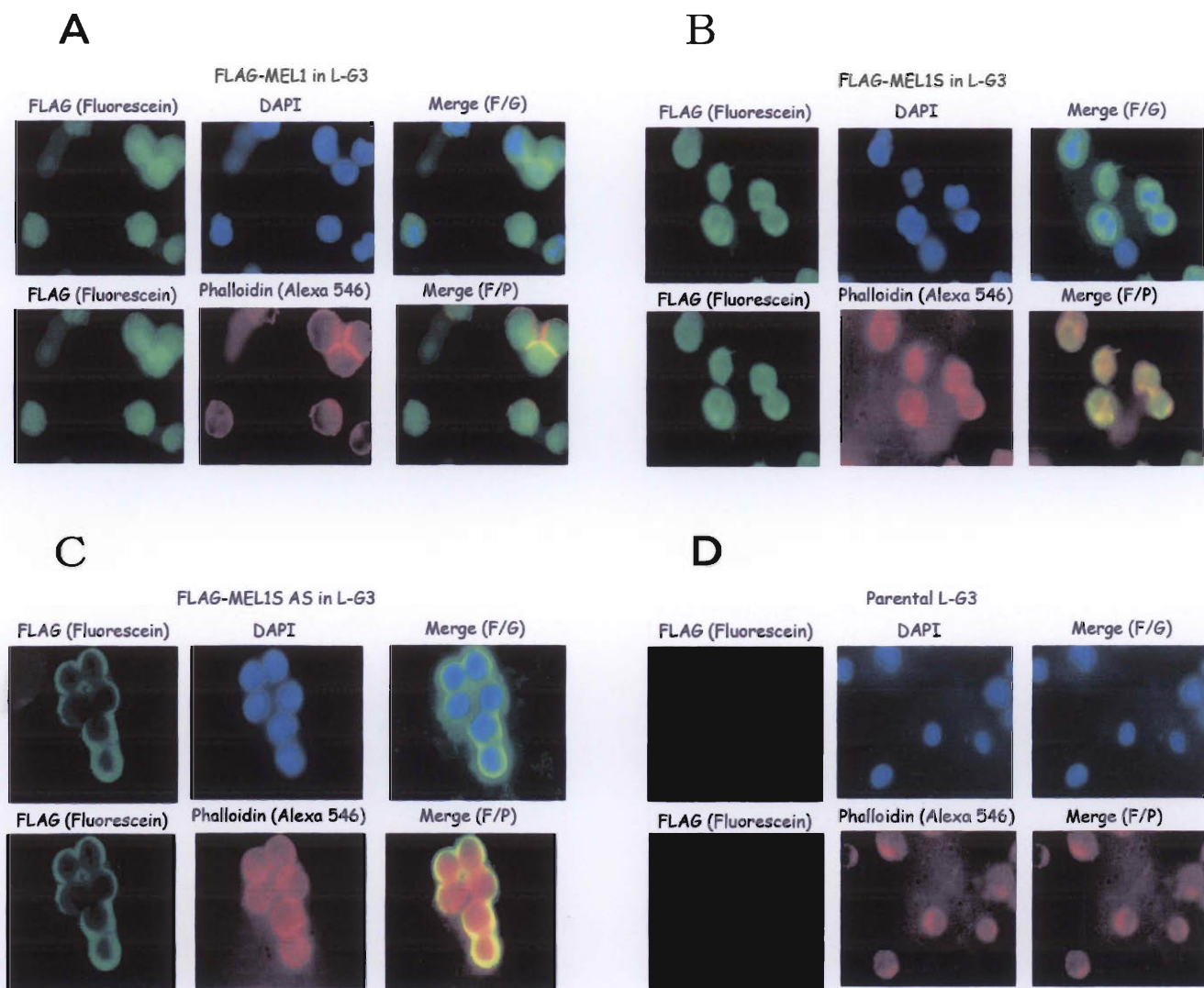
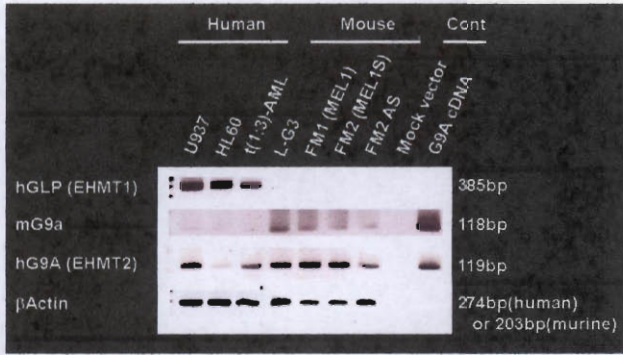


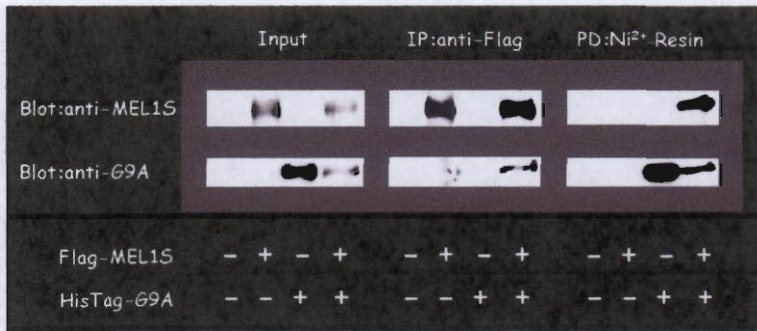
図9 IL3依存性マウス骨髄細胞株L-G3を用いた場合、MEL1Sは細胞質と核に存在する。

- A : MEL1は細胞質と核で検出された。
- B : MEL1Sは細胞質と核で検出された。
- C : 非CtBP結合型MEL1S変異体ASは多くは細胞質、一部は核で検出された。
- D : Parental L-G3の場合、特異抗体は全く反応しなかった。

A



B



C

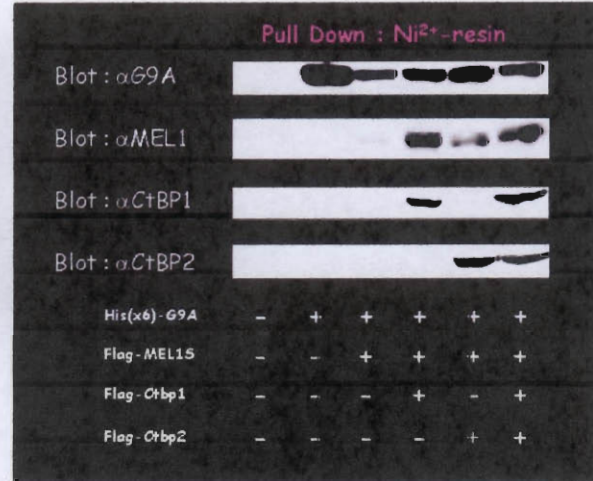


図 10 MEL1Sはメチル化酵素G9Aと相互作用する。CtBPはこの相互作用を安定化させる。

- A : RT-PCRの結果, t(1;3)転座を有するヒト白血病細胞にはhG9A, MEL1S安定発現株を作製したマウスL-G3細胞にはmG9Aが発現していた。
- B : 免疫沈降Western解析により, MEL1SとG9Aの相互作用を確認された。
- C : CtBPの共存により, MEL1SとG9Aの相互作用は安定化した。