

201209011B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

MLL-AF4白血病の分子標的薬創製を目指したAF4特異的な分解経路の解明

平成23-24年度 総合研究報告書

研究代表者 横山 明彦

平成25(2013)年 5月

目 次

I. 総合研究報告 MLL-AF4白血病の分子標的薬創製を目指したAF4特異的な分解経路の解明に関する研究 横山明彦	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	14
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	15

MLL-AF4白血病の分子標的薬創製を目指したAF4特異的な分解経路の解明

研究代表者 横山 明彦 京都大学 准教授

研究報告書

研究要旨： 多くの乳児白血病が現行の治療法でよく治癒する中で、*MLL-AF4* 融合遺伝子を発現する急性リンパ性白血病は生存率が悪く、新規の治療法が求められている。乳児は後の発育不良の可能性を考えると治療法が限られるため、できるだけ副作用の少ない分子標的薬を開発する事が治癒率の向上及び治癒後の QOL の改善に必要である。*MLL* と様々な遺伝子によって形成される融合遺伝子は骨髄性、リンパ性両方の白血病に関わる事が知られているが、*MLL-AF4* 融合遺伝子は乳児の急性リンパ性白血病の主要な原因である一方で、成人の骨髄性白血病ではほとんど見られないという特徴を持つ。この事は *MLL-AF4* タンパク質には特異的な性質がある事を示唆している。我々は白血病を起こす *MLL-AF4* タンパク質が多く細胞で未知の分解経路を介して特異的に分解される事を見いだした。実際に *MLL-AF4* はこの分解経路が活性化されている骨髄系の細胞では白血病を引き起こさない。従ってリンパ性の *MLL-AF4* 白血病細胞中で、何らかの化合物／タンパク質によってこの分解経路を活性化する事ができれば、*MLL-AF4* 白血病を根絶できる可能性を示唆している。本研究で我々は、この *AF4* 特異的な分解経路の全容を明らかにする事を目指す。我々は平成 23 年度に *AF4* を不安定化する最小ドメイン(A4DD:AF4 destabilization domain)を 130 残基程にまで限定した。平成 24 年度にはこの不安定化ドメインに結合するタンパク質の同定に取り組んだ。我々はこの未知のタンパク質分解経路を明らかにすることで、長期的には人為的にこの分解経路を活性化するような薬剤を創製することを目指す。既に細胞が持っているタンパク質分解経路を利用してがん遺伝子産物を特異的に破壊する事で、副作用が少ない新規治療法を開発できる可能性がある。この *AF4* 分解経路はリンパ系以外の多くの組織で既に活性化されており、薬剤によって人為的に活性化しても他の組織に対する細胞障害性は少ないと予想される

A. 研究目的

AF4不安定化ドメインに結合するタンパク質を同定する（平成24年度）

乳児の急性リンパ性白血病の約3分の2がMLLキメラ遺伝子によって引き起こされ、その内80%がAF4を融合パートナーとするMLL-AF4によるものである。この白血病は予後が悪く新規の治療法の開発が切望されている。MLLキメラによる白血病は骨髄性、リンパ性、そして両者の混合型である場合があり、MLL(Mixed Lineage Leukemia)という名前の由来になっている。しかし、MLL-AF4は、なぜかリンパ性の白血病を引き起こすが骨髄性の白血病はほとんど起こさない。我々はAF4ファミリータンパクであるAF5q31とMLLのキメラ(MLL-AF5q31)とMLL-AF4の相違点を調べたところ、「MLL-AF5q31は骨髄性の造血細胞を不死化する活性を持つが、MLL-AF4にはその活性が無い事」や、「MLL-AF4タンパク質は様々な細胞で不安定化されており、未知のメカニズムで分解されてしまう事」を見いだした。これらの知見から「MLL-AF4は骨髄性の細胞ではAF4特異的な分解経路によって分解されてしまうために機能しないが、リンパ性の細胞ではその分解経路が働かないために白血病を引き起こす」と考えられる。もし細胞に元からMLL-AF4を分解する装置があるのならば、その装置をリンパ性白血病細胞において人為的に活性化することでMLL-AF4白血病細胞を根絶することができるかも知れない。

研究目標: AF4特異的な分解メカニズムを解明し、 リンパ系で分解経路を活性化する分子標的薬を創製する

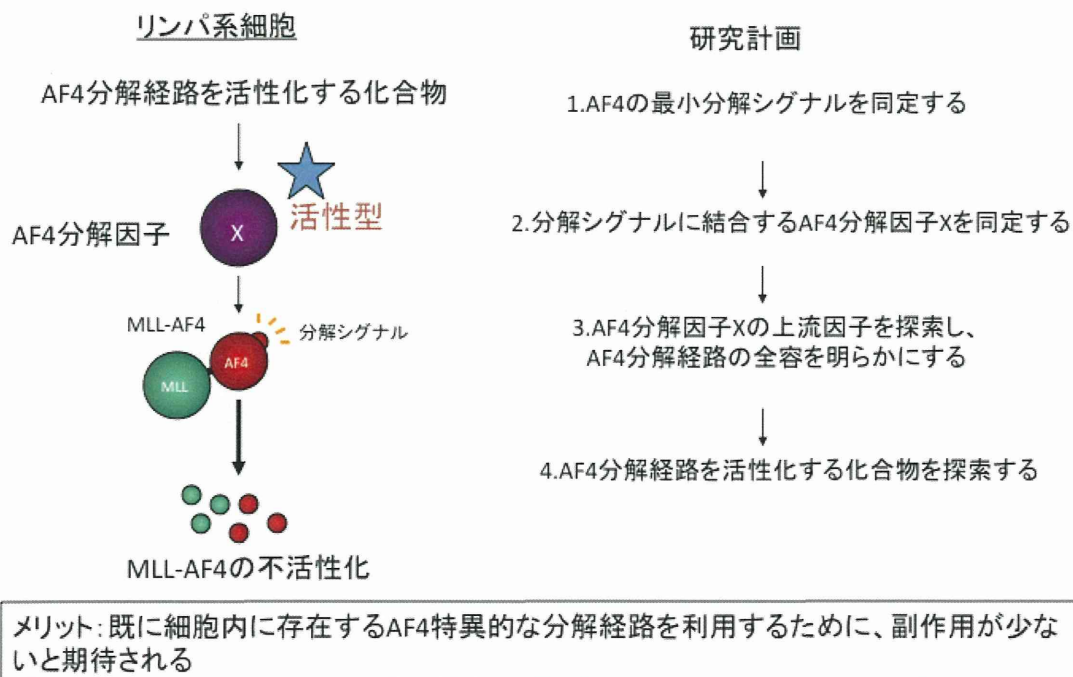


図1 研究計画の概要 長期的にはリンパ系でMLL-AF4を不安定化させ、不活性化させる化合物の同定を目指し、短期的にはAF4の分解経路の解明に取り組む。

このAF4特異的な分解経路はまだ明らかにされておらず、我々はその作用機序を調べる事で新規の分子標的治療法を開発するための分子基盤を見いだしたいと考えている（図1）。我々は平成23年度中にAF4には存在するがAF5q31には存在しない不安定化ドメインの同定を行った。平成24年度にはAF4特異的な不安定化ドメインに結合するタンパク質の同定に取り組んだ。

B. 研究方法

我々は難治性の乳児白血病を引き起こすMLL-AF4タンパク質が多くの組織・細胞でAF4特異的な分解経路によって分解される事を見いだした。長期的にはこの分解経路を利用した分子標的療法を開発する事を見据え、この分解経路の解明を試みる（図1）。そのために、様々なMLL-AF4の変異体を作成し、そのタンパク質の発現や骨髄前駆細胞を不死化する活性を調べる事で、まずAF4の不安定化に必要な最小ドメインを決定する。次に、この不安定化ドメインに結合するタンパク質を同定する事を試みる。そのために細胞内にAF4不安定化ドメインを一過性に発現させ、不安定化ドメインとその結合因子の複合体をワンステップアフィニティー精製法にて精製する。その後、精製物の質量分析を行い、結合因子を同定する。

1. AF4の不安定化に必要な最小ドメインを決定する（平成23年度）

様々なMLL-AF4変異体を作製し、そのタンパク質安定性及びマウス骨髄前駆細胞に対するトランスフォーメーション活性を調べる事で、AF4特異的な不安定化ドメインA4DDを同定する。さらに新たな変異体を作製して詳細な変異体解析を行う事で、最小不安定化モチーフを同定する。また、リンパ性の細胞株（Ba/F3など）にそれらの変異体遺伝子を導入し、変異体のタンパク質レベルでの発現を調べる。これによってリンパ系の細胞で確かに安定化されるかどうかを調べる。

2. AF4不安定化ドメインに結合するタンパク質を同定する（平成24年度）

我々は難治性の乳児白血病を引き起こすMLL-AF4タンパク質が多くの組織・細胞でAF4特異的な分解経路によって分解される事を見いだした。また、様々なMLL-AF4の変異体を作成し、そのタンパク質の発現や骨髄前駆細胞を不死化する活性を調べる事で、まずAF4の不安定化に必要な最小ドメインを決定した。この不安定化ドメインとFLAG tagをつけたGAL4 DNA binding domainの融合タンパク質を発現するベクターを作製し、293T細胞に一過性に発現させ、抗FLAG抗体を用いたaffinity精製にて目的タンパク質とその結合因子を精製する。その後、精製物を質量分析装置にて解析し、結合因子を同定する。293T細胞は造血系の細胞ではないが、我々はこの細胞株においてもAF4がAF5q31に比べて不安定化されている事を示す予備的実験結果を得ており、目的とす

るAF4不安定化タンパク質の同定が出来ると考えた。

動物実験は「厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針」及び「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従い、施設内動物倫理委員会の承認を受けて、生命の尊重と苦痛を伴う実験への十分な配慮の基に実施する。遺伝子組み換え実験は、施設内組み換え実験安全委員会の承認を受け、遺伝子組み換え実験安全管理規定に従って行う。本研究では、個人情報の取り扱いの配慮を必要とするヒト検体等は用いない。ヒトES細胞は扱わない。

C. 研究結果

平成23年度

我々は、当初の計画通り、平成23年度中にAF4特異的な分解に必要な130残基程の最小ドメイン構造（A4DD）を決定した（図2）。

MLL-AF4はAF4 destabilization domain特異的に分解される

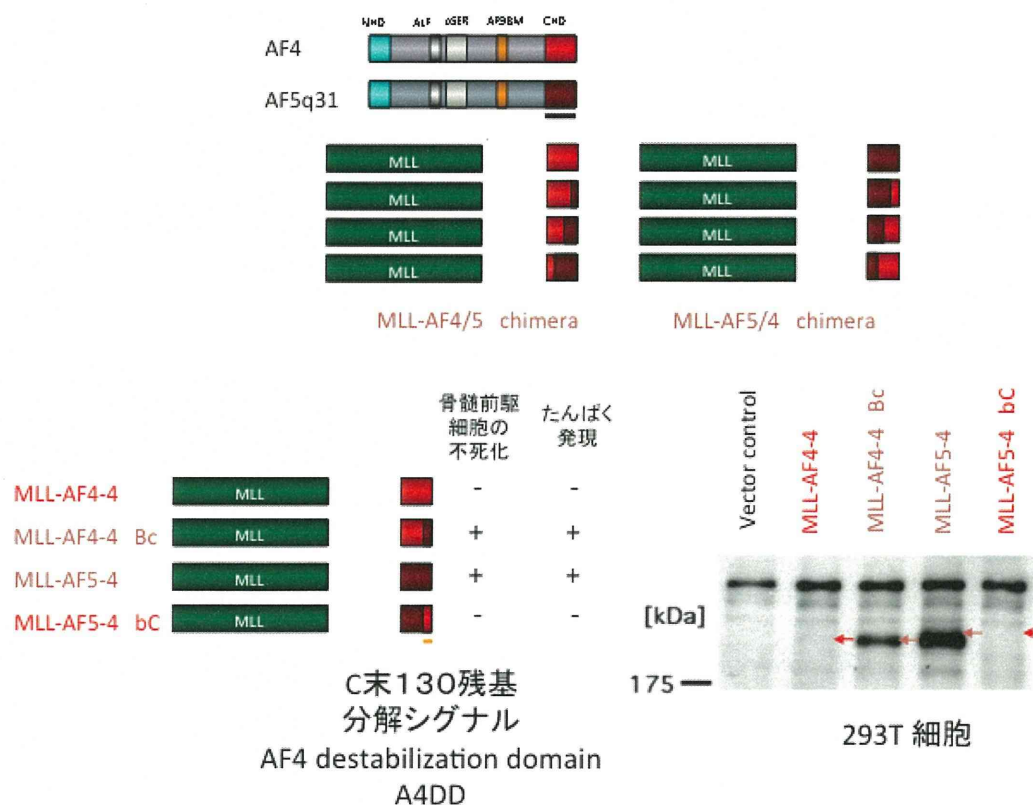


図2 AF4 destabilization domain (A4DD)の同定

不安定化を受ける MLL-AF4 と不安定化を受けない MLL-AF5q31 のドメインスワップミュータントを作製し、そのタンパク質発現と骨髄前駆細胞の不死化能を調べた。その結果、AF4 の C 末端側 130 残基が A4DD である事がわかった。A4DD をもつ MLL-AF4 変異体は安定に発現されないし、骨髄細胞を不死化する能力もない。

A4DDの構造はAF4ファミリー間で保存されているC-terminal conserved domainの中にあるが、この中のAF4にユニークな配列が不安定化の原因になっていると考えられる（図3）。

AF4 destabilization domain:A4DD

図3 AF4 不安定化ドメイン

AF4 destabilisation domain (A4DD)

```

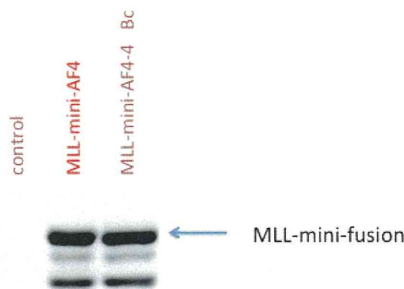
AF4      1078-NKHESSSKVAQAPSP-CIAS--TGTSPPLSPMPSPASSVGSQSSAGSVGSSGVAATI-STPVTIONMTS-1143
AF5q31  1029-TEHLKNSYNNSQAPSP-GLGSKAVGMPSVSPKLSFGNSGNYSAGASSASAGSSVTI---PQRIHQMAA-1094
LAF4    1116-IDYFKNSKAAQAPSPWAGSGKSTGTPSPMSPNPSPASSVGSQGLSNASALSPS-TIVSIPQRIHQMAA-1184
      + + + + +
AF4      1144-SIVTITSHVLTAFDLWEQAEALTRK-NKEFFARLSTNVCTLALNSS-LVDLVHYTRQGFOQLQELTKTP -1210
AF5q31  1095-SIVQVTSNFLYATEIWDQAEQLS-KEQKEFFAELDKVMGPLIFNASIMTDLVRITRQGLHHLRQDAKLIS-1163
LAF4    1185-NHVSITNSILHSYDYWEMADNLA-KENREFFNDLDLLMGPVTLHSS-MEHLVQYSQGLHHLRNSAHLIS
      *** ** * + * + + * * + * + * + * + * + * + * + * + *
    
```

AF4 ファミリータンパク質におけるAF4 不安定化ドメインのアミノ酸配列。

さらに、我々はこのドメインを持つタンパク質がリンパ系の細胞株であるBa/F3細胞では安定して発現する事を見いだした（図4）。これらの結果はMLL-AF4がリンパ系では安定で骨髄系では不安定であるという知見を支持する。

A4DDはリンパ系の細胞ではタンパク質を不安定化しない

図4 A4DD はリンパ系の細胞では不安定化されない。



Ba/F3 細胞: マウス リンパ系細胞

マウスのリンパ系細胞株である Ba/F3 細胞に AF4-4 及び AF4/5 Bc をもつ MLL 融合蛋白質を安定的に発現させ、そのタンパク質レベルを調べた。

次に我々は、次にA4DDに特異的に結合するタンパク質の同定を試みた。我々はこれまでに293T細胞は骨髄系の細胞ではないがこの細胞においてもAF4が不安定化される事を見いだしていた。そこで、293T細胞に一過性に任意の遺伝子を発現させ、One step affinity purificationにて精製することで、共作用因子を同定する手法を採用した。我々は、FLAGタグを持ったGAL4 DNA binding domainにAF4のC末端部分を融合させたFLAG-GAL4-AF4-4タンパク質の発現ベクターとそのAFDDをAF5q31の構造で置き換えた安定化変異体であるFLAG-GAL4-AF4-4Bcの発現ベクターを構築した。293T細胞にFLAG-GAL4-AF4-4タンパク質及びFLAG-GAL4-AF4-4Bcタンパク質を一過性に発現させ、抗FLAG抗体を用いたaffinity精製を行った。この際我々はまず、293T細胞を段階的な抽出によって三つの分画に分け、そのうちの二つの分画からaffinity精製を行った。三つの分画とは、可溶性タンパク質からなる可溶性画分、クロマチン構成因子からなるクロマチン画分、残りのタンパク質からなる難溶性画分であり、我々は可溶性画分とクロマチン画分から、それぞれ精製を行った（図5）。

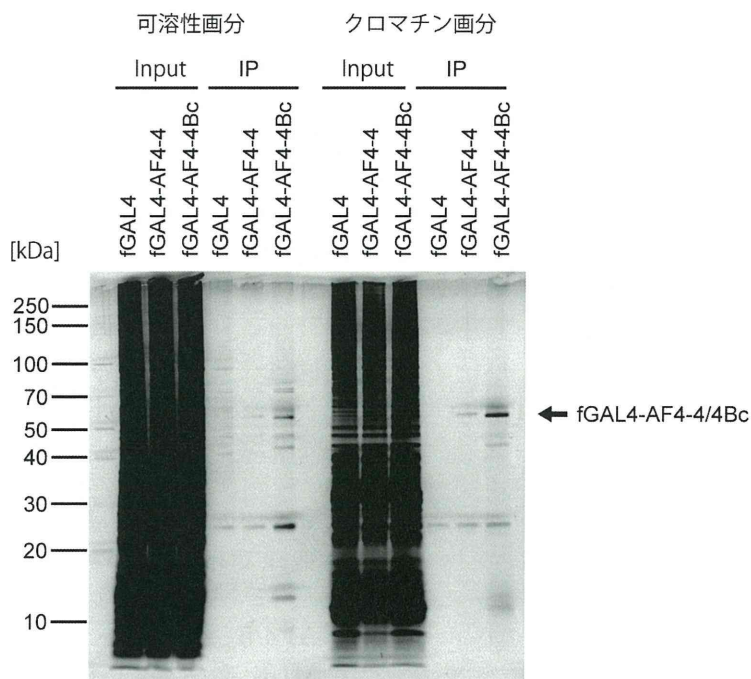


図5 AF4不安定化ドメインに結合する蛋白質の同定
293T細胞にFLAG-GAL4, FLAG-GAL4-AF4-4, FLAG-GAL4-AF4-4Bcを一過性に発現させ、可溶性画分とクロマチン画分に分画した後抗FLAG抗体を用いてそれぞれの蛋白質とその結合蛋白質を精製した。精製物はSDS-PAGEにて分離後銀染色にて蛋白質を可視化した。

得られた精製物の質量分析を行ったところ、様々なタンパク質が同定された。可溶性画分においてAF4と結合するが安定型のAF4-4Bc変異体とは結合しないタンパク質はLIG3, PNKP, TOP2B, XRCC1, RPA1, LEMD2, DHX30などであった(表1)。しかし、これらのタンパク質の多くはDNA repairやDNA metabolismに関するものであり、タンパク質分解に関与するとは考え難いものばかりだった。一方で、AF4-4Bcには結合してAF4-4には結合しないタンパク質として、USP9X, TMEM43, CSNK2A2, AGPSが同定された(表2)。クロマチン画分においてはAF4-4特異的な結合タンパク質はなく、AF4-4Bc特異的な結合タンパク質として、HADHA, RPL7, DSG1, NCL, HISTH1C/E, AZGP1, USP9X, PPM1G,

TOMM10A, HNRNPR, RPL13, SEC63などが同定された(表3)。同定したAF4特異的結合因子の中で、タンパク質の分解に関わると予想されるものはなかった。一方、AF4-4Bcに結合するタンパク質の中にはタンパク質の安定性に関与すると考えられるものが含まれていた。可溶性画分において、HSP4Aという分子シャペロンがAF4-4Bcに結合するが、AF4-4には結合しない(表2)。この事は特定の分子シャペロンに認識され易いかどうかの違いがタンパク質の安定性の違いを生み出している可能性を示唆している。また、AF4-4Bc特異的に結合するタンパク質の一つであるUPS9Xが脱ユビキチン活性を持つ事から、AF4-4が分解され易く、AF4-4Bcが分解されにくいのはUPS9XがAF5q31特異的に結合し、ユビキチン経路を介した分解を抑制している事によって決定されている可能性が考えられた。我々は、UPS9Xが実際にAF4-4Bc特異的に結合するかどうかはUPS9X特異的な抗体を用いて検証した。その結果、確かにUPS9Xが可溶性画分でもクロマチン画分でもAF4-4Bc特異的に結合している事が確認された(図6)。

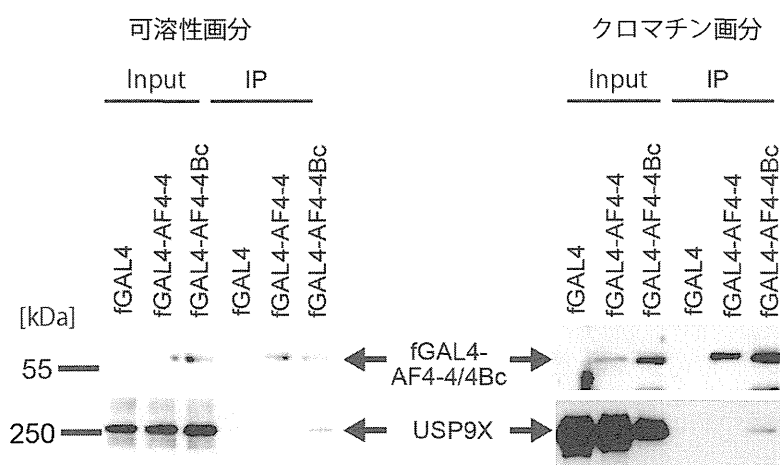


図6 USP9XがAF5q31のA4DD相当部分に特異的に結合する。

図2にて精製した蛋白質をSDS-PAGEにて分離後Immunoblottingにて可視化した。AF5q31のA4DD部分に相当する構造を持つFLAG-GAL4-4Bc蛋白質に特異的にUPS9Xが共沈してくる。

D. 考察

今回同定されたA4DDにはAF4タンパク質を不安定化する活性があると考えられる。また、MLL-AF4は骨髄系の細胞では活性を示さないが、リンパ系の細胞では安定に発現される事から、組織特異的な不安定化を受けていると考えられる。AF4を不安定化する因子を同定し、さらにその上流で働く因子群を探索する事で分解経路に関わる因子群を網羅的に同定できる。そして、それらのAF4不安定化因子群の発現がリンパ系と骨髄系とでどのような発現パターンをとるかを調べる事で組織特異的な制御のメカニズムに迫れるだろうと思われた。我々は、まず、骨髄系に発現し、A4DDに結合してAF4を特異的に不安定化する因子の存在を想定した。293T細胞は骨髄系の細胞ではないが、AF4を不安定化する細胞であるため、この細胞を用いて、A4DD結合因子の同定に取り組んだ。しかし、残念ながら今回の実験では、AF4の不安定化モチーフに結合して特異的にタンパク質分解を促進する因子を同定することはできなかった。一方で、AF5q31のA4DD相当部分に結合してタンパク質分解を抑制する働きをもつ結合因子が同定された。一つの可能性として、A4DD

を認識して特異的に分解するタンパク質は存在せず、モチーフの構造そのものが、正常な折りたたみがされにくいものであり、多くの細胞では成熟したタンパク質として産生されずに、分解されているという事が考えられる。その場合、リンパ系の細胞で特異的に発現する分子シャペロンのようなものが機能的なAF4の産生を可能にしているのかもしれない。今後はその可能性を視野に入れて、「骨髄系で特異的にAF4を分解する因子」と「リンパ系で特異的にAF4の折りたたみを助けるシャペロン」の両方を探索していきたい。

E. 結論

平成23年度に得られた結果から、当初の仮説の通り、MLL-AF4は骨髄系では不安定化を受けており、リンパ系では受けていないと結論する。AF4特異的な分解経路を同定する目的で、AF4の不安定化モチーフに特異的に結合するタンパク質を探索した結果、幾つかのタンパク質が同定されたが、それらの多くはDNA repairやDNA metabolismに関するものが多く、タンパク質分解に関与する事がわかっているものは含まれていなかった。一方、不安定化されないAF5q31のA4DD相当部分に結合するタンパク質が同定された。そのうちの一つはUSP9Xであり、この分子はタンパク質分解の目印であるユビキチンを切断する活性を持つ事から、タンパク質分解を抑制する働きがあると考えられる。これらの結果から、AF4の不安定化はA4DD構造の折りたたまれ難さに起因するものであり、AF4以外のAF4 familyタンパク質は同様の構造を持つが、比較的折りたたまれ易いか、USP9Xなどの特定のタンパク質と相互作用する事で分解から逃れている可能性が示唆された。AF4がリンパ系の細胞で機能するためには、リンパ系においてAF4を安定化する因子が存在するのかもしれない。今後はリンパ系の細胞で特異的にA4DDと作用して安定化する因子の探索を進めるべきである事がわかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Molecular mechanisms of leukemogenesis in MLL-leukemias Rinsho Ketsueki 2011 52(8) 679-685.

2. 学会発表

平成23年度 第3次対がん10か年総合戦略（平成16年~25年度）・ 文部科学省 がん研究分野の特性

等を踏まえた支援活動合同公開シンポジウム（招待講演）

「MLL 白血病と転写制御」三重先端がんフォーラム(招待講演)、平成24年4月7日、三重大学医学部

「Molecular mechanism of MLL fusion-dependent transformation」2013 USA-Japan Science Conference（日米造血器腫瘍セミナー）（招待講演）平成25年3月24-26日、Makena Beach and Golf Resort, Maui, Hawaii、USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

表1 可溶性画分でAF4-4特異的に結合する因子 (数値は質量分析におけるスコアを示す)

Gene Symbol/Sample Name	CSK Vec	CSK AF4-4	CSK AF4-4Bc
TOP2A	0	61.34	2.98
LIG3	0	32.57	6.85
PARP1	0	18.11	2.17
PNKP	0	15.16	0
TOP2B	0	15.01	0
XRCC5	0.14	12.95	3.55
XRCC1	0	12.07	2.89
RPA1	0	11.68	2.12
LEMD2	0	11.28	2.12
DHX30	0	8.14	0
SLC25A13	0.09	5.75	0
TTF2	0	5.42	0
PEO1	0	4.93	0
SMC4	0	4.83	0
HNRNPA1	0	4.80	0
SATB1	0	4.56	0
LMNA	0	4.11	0
PABPC1	0	4.10	0
LMNB1	0	4.05	0.89

表2 可溶性画分でAF4-4Bc特異的に結合する因子（数値は質量分析におけるスコアを示す）

Gene Symbol/Sample Name	CSK Vec	CSK AF4-4	CSK AF4-4Bc
USP9X	0	0	25.71
HADHB	0	2.11	16.08
WDR18	0	4.56	16.00
TMEM43	0	2.86	15.92
CSNK2A2	1.62	0	13.97
TUBA1A	0	0	13.46
HSPA4	0.81	0	12.21
TEX10	0	2.00	10.68
AGPS	0	0	10.54
AFF4	0	0	8.47
ACTA1	0	0	7.66
HK1	0	0.24	7.32
TRIM26	0	0	7.15
ACSL3	0	0	7.08
HSPH1	0.94	0.71	6.82
BSG	0	0	5.86
APMAP	0	0	5.48
SET	0	0	4.69
SENP3	0	0.63	4.20
APLP2	0	0.07	4.09
OCIAD1	0	0.09	4.07
MSN	0	0	4.04
ABCD3	0	0	4.00
MOSC1	0.26	0	4.00

表3 クロマチン画分でAF4-4Bc特異的に結合する因子 (数値は質量分析におけるスコアを示す)

Gene Symbol/Sample Name	NUC Vec	NUC AF4-4	NUC AF4-4Bc
HNRNPM	0	3.55	48.25
PARP1	0.30	3.90	36.34
HADHA	0	1.38	29.09
AFF4	0	8.09	26.45
DDX21	0	0	16.26
RPL7	0	0	15.57
TOP2A	0	0	15.44
DSG1	0.18	0	15.34
NCL	0	0	14.88
POR	0	1.62	14.37
HIST1H1E	0	0	12.03
AZGP1	1.47	0.25	11.85
PPM1G	0	0	10.57
TOMM70A	0	0	10.50
TUBA1A	0	0	9.57
HNRNPR	0	0	9.56
WDR18	0	0	9.42
RPL13	0	0	9.35
CENPB	0	0.40	9.11
ANP32B	0	0	8.98
PELP1	0	0	8.58
SEC63	0	0	8.27
RCC1	0	0.28	8.22
TOP1	0	0	8.22
RBM14	0	0	8.16
SDHA	0	0	8.06
RPS6	0	0	8.00
DDB1	0	0	7.76
CKAP4	0	1.21	7.66
SRPR	0	0	7.63
H2AFY	0	0	7.60
BSG	0	0.51	7.45
AGPS	0	0	7.45
SLC25A11	0	0	7.21
ILF3	0	0.17	7.12
IGF2BP1	0	0	6.61
SND1	0	0	6.50
CDC73	0	0	6.38

RPS8	0	0	6.25
GNAI3	0	0	6.05
USP9X	0	0	6.01
HOXD13	0	0	6.01
TMPO	0	0	6.00
SET	0	0	6.00
TBL2	0	0	6.00
RPL7A	0	0	5.92
SLC25A13	0	0.22	5.82
RPS3A	0	0	5.76
RPL3	0	0	5.13
VAPB	0	0	4.80
RPL6	0	0	4.44
PGAM5	0	0	4.22
ZNF384	0	0	4.15
PAF1	0	0	4.06
SLC25A4	0	0	4.04
CADM1	0	0	4.03
LAMP1	0	0.50	4.00
ANP32A	0	0	4.00
LMNB2	0	0	4.00
MTDH	0	0	4.00
RPL8	0	0	4.00
STXBP3	0	0	4.00
CASP14	0	0	4.00

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

特になし

雑誌

発表者氏	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yokoyama A	Molecular mechanisms of leukemogenesis in MLL-leukemias	Rinsho Ketsueki.	52 (8)	679- 685	2011

MLL 白血病の分子メカニズム

横山明彦

Key words : MLL, AF4, AEP, Leukemia

1. MLL 白血病の概要

MLL 遺伝子上で染色体転座が起こり, MLL と融合パートナーが in-frame で繋がった MLL fusion が形成されると白血病を引き起こす (図 1A, 1B)。MLL 遺伝子の染色体転座を持つ白血病 (以下 MLL 白血病) は全急性白血病の 5~10% を占め^{1,2)}, 急性骨髄性白血病 (AML), 急性リンパ性白血病 (ALL), 混合型白血病など様々な表現型を持った白血病を含む。このことから, MLL 遺伝子は Mixed Lineage Leukemia の頭文字をとって名付けられた。MLL の融合パートナーは多岐にわたり, これまでに 60 種類以上であると報告されている^{3,4)}。また, MLL 白血病は比較的若年層に多く, 乳児の ALL において高頻度に起こる遺伝子異常であり, 予後は他の白血病に比べて悪い傾向がある^{1,5)}。

2. MLL は自己複製促進遺伝子の発現を維持する

MLL は 3969 残基のアミノ酸からなる巨大なタンパク質であり, ショウジョウバエの HOX 遺伝子制御因子である Trithorax (TRX) と良く似た構造を持つ。MLL や TRX のカルボキシル末端側には SET ドメインがあり, この構造はヒストン H3 の 4 番目のリジン残基をメチル化する活性を持つ⁶⁾。MLL も TRX もこれまでに遺伝子改変技術を使った解析によって, HOX 遺伝子の発現を維持するのに必要である事が示されている^{7~10)}。MLL は翻訳後プロセッシングを受け, MLL^N と MLL^C の二つのフラグメントに分断されるが, 両フラグメントは結合してホロコンプレックスを形成し¹¹⁾, さらに menin や WDR5 などの共作用因子と結合して MLL 複合体を形成する¹²⁾ (図 1C)。MLL は造血系の細胞においても HOX 遺伝子の発現を維持する働きを持ち, これまでに

HOXA7, HOXA9, HOXA10, MEIS1 といった遺伝子の発現が MLL によって維持される事が分かっている^{9,10)}。これらの遺伝子は造血幹細胞の自己複製を促進する働きを持つ^{13,14)}。例えば, HOXA9 を過剰発現させると造血幹細胞のプールサイズが大きくなる事や, Hoxa9 ノックアウトマウスの造血幹細胞プールは縮小している事が報告されている^{14,15)}。これらの遺伝子を本稿では「自己複製促進遺伝子」と総称する。この自己複製促進遺伝子は造血幹細胞 (HSC) やその下流の MPP で高発現しているが, CMP, GMP と分化する過程で発現が低下し, 最終分化した細胞では発現していない (図 2A)^{16,17)}。MLL のノックアウトマウスの造血細胞においては自己複製促進遺伝子の発現が低下すると共に, HSC や MPP のプールサイズが縮小する^{9,10,18)}。これらの知見から, MLL は未分化な造血細胞において自己複製促進遺伝子の発現を維持する事で HSC や MPP を増幅させる働きをしていると考えられる。

3. AEP 複合体は MLL 依存性の転写を活性化する

「MLL がどのようなメカニズムで標的遺伝子の転写を活性化するのか」という事は良く分っていない。我々は近年, MLL の融合パートナーの解析から, そのメカニズムの一端を見いだした。MLL の融合パートナーは前述したように 60 種類以上あるが, その発症頻度はパートナーごとに大きく異なる^{3,4)} (図 1D)。最も高頻度に MLL と融合するのは AF4 であり, そのホモログである AF5q31 や LAF4 も MLL fusion を形成する。この AF4 ファミリーは MLL 白血病症例の約 3 分の 1 で融合パートナーとなっている。次に高頻度に MLL と融合するのは AF9 であり, そのホモログである ENL もまた比較的高頻度に MLL と融合タンパク質を形成する。この二つを含む ENL ファミリーも MLL 白血病の約 3 分の 1 の症例で融合パートナーとなっている。我々は AF4 の複

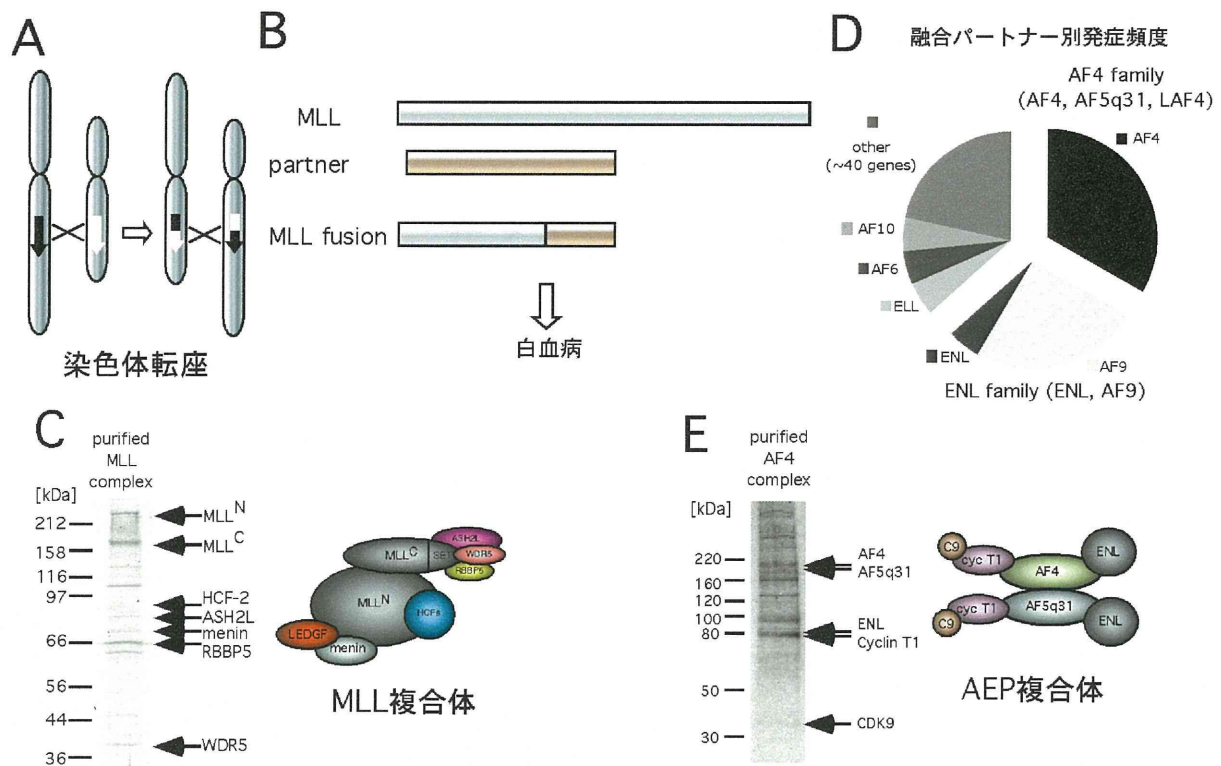


図 1 A. 染色体転座による融合遺伝子の形成
 B. MLL と partner 遺伝子が融合して MLL fusion を形成する
 C. MLL の融合パートナー別発症頻度³⁾
 D. MLL 複合体¹²⁾ 精製した MLL 複合体を SDS-PAGE によって分離し、CBB 染色した。
 E. AEP 複合体¹⁹⁾ 精製した AEP 複合体を SDS-PAGE によって分離し、銀染色した。

合体を生化学的に分離精製して質量分析を行い¹⁹⁾、AF4 がそのホモログである AF5q31 と、ENL、CDK9 及び CyclinT1 と複合体を形成している事を見いだした (図 1E)。即ち、MLL 白血病症例の 3 分の 2 を占める AF4 ファミリーと ENL ファミリーが同一複合体に含まれるという事になる。CDK9 と CyclinT1 は結合して P-TEFb と呼ばれる複合体を形成する事が知られている²⁰⁾。P-TEFb は RNAPolymeraseII の Heptapeptide repeat のセリン 2 をリン酸化し、転写伸長を促進する働きを持つ。従ってこの AF4 複合体も RNAPolymeraseII に直接作用して転写を促進する働きがあると予想される。我々はこの複合体を AEP 複合体 (AF4 family/ENL family/P-TEFb complex) と呼ぶ。

MLL 依存性の転写における AEP 複合体の役割を調べるために、野生型の MLL を発現する細胞株である U937 細胞を用いてクロマチン免疫沈降実験 (ChIP) を行ったところ、MLL 複合体と AEP 複合体が *HOXA9* や *MEIS1* などの遺伝子領域で共局在している事が明らかになった (図 3A)¹⁹⁾。さらに sh-RNA を用いて AEP 複

合体の一因子である ENL をノックダウンしたところ、*HOXA9* や *MEIS1* の発現が低下した¹⁹⁾。この結果は MLL 複合体と AEP 複合体が協調的に作用して転写を活性化しているという事を示唆した (図 2B)。一方で、*HOXA7* の遺伝子領域には MLL 複合体は局在していたが、AEP 複合体は局在していなかった (図 3A)。またこの領域ではあまりリン酸化型 RNAPolymeraseII の局在も見られないことから、転写が活発に起こっていない事が示唆された。さらに、*HOXA7* の発現は ENL をノックダウンしても変化しなかった。これらの結果は MLL 複合体の局在は必ずしも AEP 複合体の局在を伴うものではなく、AEP 複合体は何らかのシグナルに依存して MLL 複合体が局在するクロマチンにリクルートされるという事を示唆している。自己複製促進遺伝子の転写は分化の進んだ細胞においては抑制されている事から、MLL 依存性の転写は分化の進行に伴って ON から OFF になると予想される (図 2B)。このように MLL 依存性の転写が分化に伴って調節される事により、細胞の自己複製が適度に活性化され、HSC の適切なプールサイズ

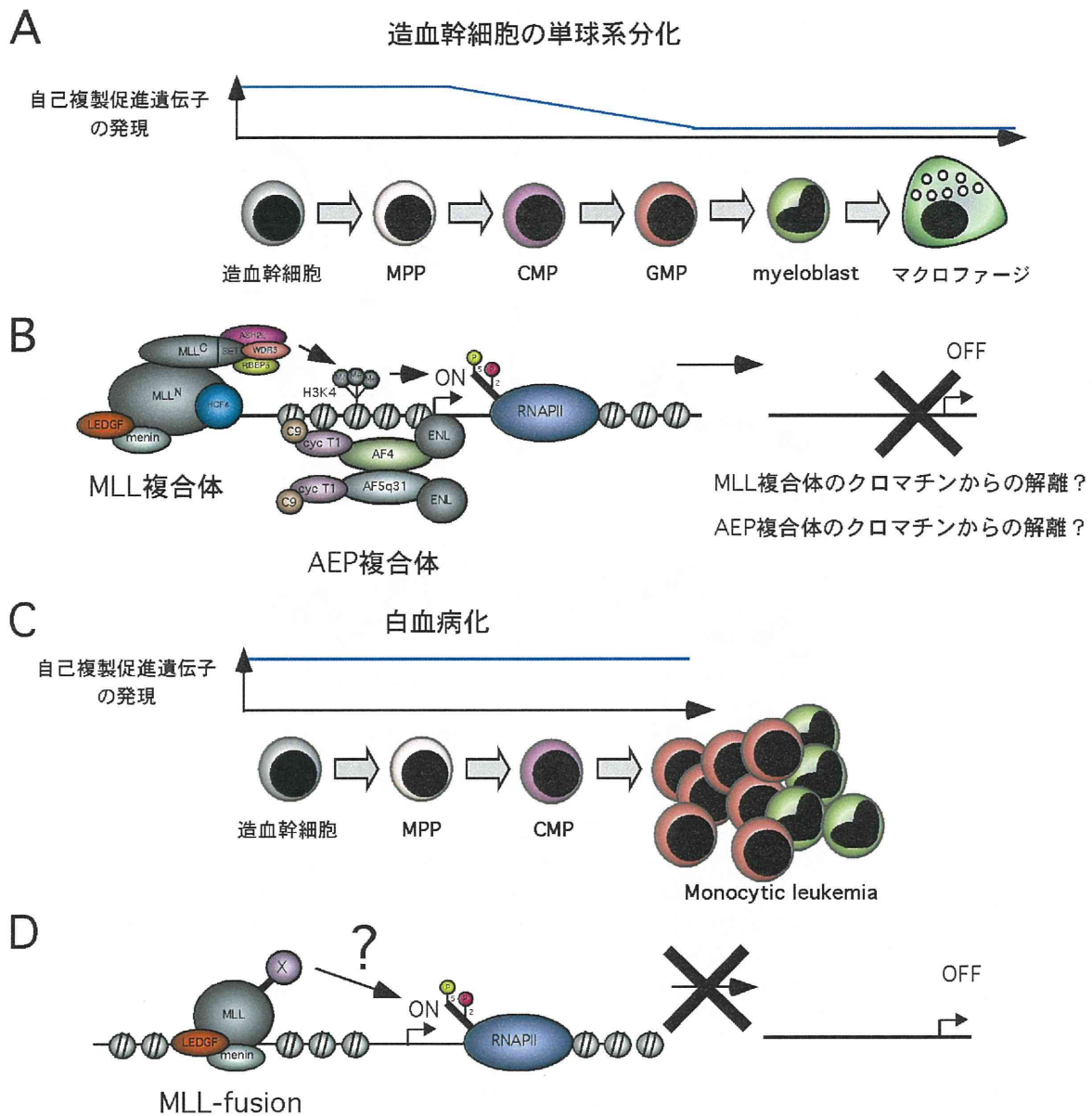


図2 A. 単球分化における自己複製促進遺伝子の発現パターン
 B. MLL 複合体及び AEP 複合体の協調作用による自己複製促進遺伝子の発現とその分化の進行に伴う不活性化モデル
 C. 白血病化における自己複製促進遺伝子の発現パターン
 D. MLL fusion による未知のメカニズムを介した恒常的な転写活性化

が維持されるのであろう。分化の進行に伴ってどのようなメカニズムで転写が OFF になるのかはまだ分かっていないが、何らかのシグナルに呼応して MLL 複合体や AEP 複合体がクロマチンから解離するなどして、MLL 依存性の転写活性が失われるのであろうと予想される(図 2B)。

4. MLL fusion は AEP 複合体を介して自己複製促進遺伝子を恒常的に活性化して造血細胞を不活化する

MLL 白血病患者の芽球において *HOXA9* や *MEIS1* などの自己複製促進遺伝子が高発現している事が、遺伝子発現プロファイリングによって明らかにされている¹⁵⁾。この事から、MLL fusion は、通常であれば分化の進行

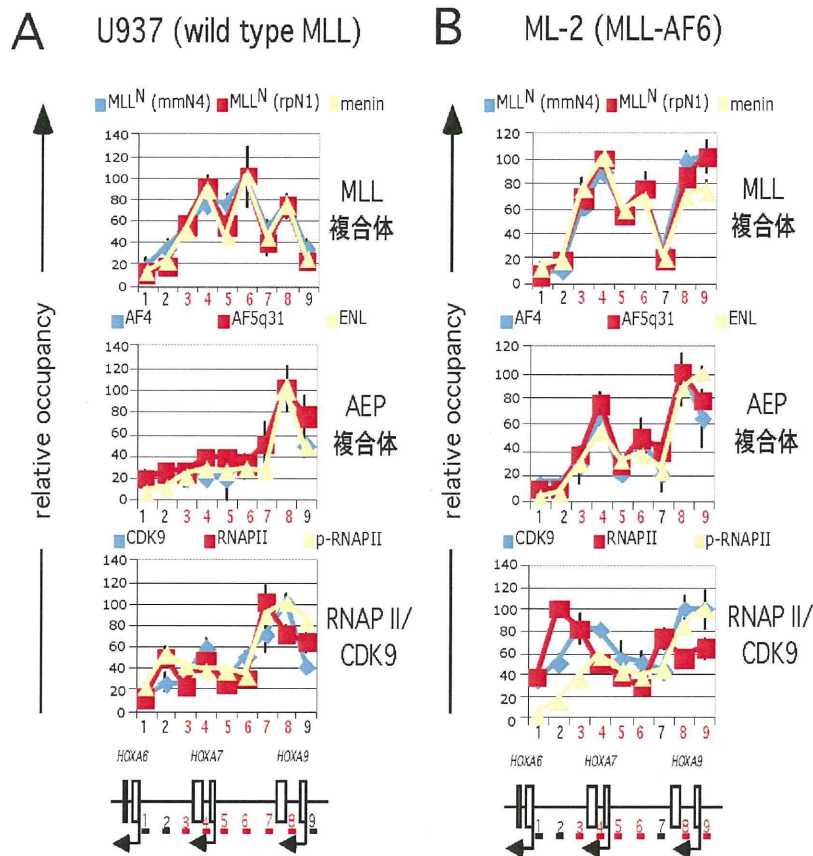


図3 A. 野生型 MLL を発現する U937 細胞における ChIP アッセイ MLL 複合体の構成因子に対する抗体 (上段), AEP 複合体構成因子に対する抗体 (中段), CDK9, RNAPolymeraseII, リン酸化型 RNAPolymeraseII に対する抗体 (下段) により ChIP アッセイを行った。プライマーのポジションを下に示す¹⁹⁾。
 B. MLL-AF6 を発現する ML-2 細胞における ChIP アッセイ A と同様に実験を行った¹⁹⁾。

に伴って低下するはずの自己複製促進遺伝子の発現を恒常的に活性化することによって、異常な自己複製を引き起こし、白血病化へと導いていると予想された (図 2C, 2D)。実際、マウス骨髄から採取した未分化な造血前駆細胞にレトロウイルスベクターを用いて *HOXA9* 遺伝子を導入してやると、細胞は未分化性を維持したまま増殖し、継代を重ねても半固形培地中でコロニーを形成し続けるようになる (図 4A, 4B, 4C)²¹⁾。従って、自己複製促進遺伝子の恒常的な発現は造血細胞を不死化するといえる。同様に MLL fusion である *MLL-ENL* や *MLL-AF5q31* を造血前駆細胞に導入すると、細胞は *Hoxa9* の高発現を伴って不死化した (図 4D, 4E, 4F)。従って、確かに MLL fusion は自己複製促進遺伝子の発現を恒常的に活性化することによって、造血細胞を不死化すると思われる。では、MLL fusion はどのようなメカニズムで恒常的に転写を活性化するのか？

MLL と AF4 ファミリーの fusion である MLL-AF4 や MLL-AF5q31 を発現する細胞株において、抗 MLL 抗体を用いて免疫沈降実験 (IP) を行うと、MLL-AF4 や MLL-AF5q31 に AEP 複合体構成因子が共沈殿してくる¹⁹⁾。AF4 ファミリーはカルボキシル末端側の進化上保存された領域である CHD ドメインを介して AF4/AF5q31 ヘテロダイマーを形成する¹⁹⁾。従って MLL-AF5q31 は AF4 と結合し、さらに AF4 上の構造を介して ENL や P-TEFb と結合する。その結果、MLL と AF4 ファミリーから成る MLL fusion は MLL 複合体と AEP 複合体を足したような複合体である MLL/AEP hybrid 複合体を形成する (図 5A)。MLL-AF5q31 の CHD に変異を導入して AF4 と結合できなくなった変異体はマウス造血前駆細胞に対するトランスフォーメーション活性 (不死化能) を失っていた¹⁹⁾。また、MLL-AF5q31 で不死化した細胞において、*Enl* をノックダウンすると