

# 博士論文 (要約)

造血器腫瘍関連転写因子 RUNX1 を標的とした阻害剤の開発  
(Targeting the transcription factor RUNX1 for leukemia therapy)

米澤 大志

# 目次

<b>第一章 諸言</b>	<b>P 4-11</b>
はじめに	
RUNX1 及び CFBF との関係	
RUNX1 の造血発生での役割	
RUNX1 の正常造血での役割	
RUNX1 と翻訳後修飾	
RUNX1 変異による造血器腫瘍の形成	
RUNX1 阻害による造血器腫瘍抑制効果	
本研究の目的	
<b>第二章 RUNX1 のユビキチン化修飾機構の解明</b>	<b>P 12-56</b>
要旨	p 13
序論	p 14-15
実験材料及び方法	p 16-20
結論	p 21-54
a. AlphaScreen を用いた RUNX1 と相互作用する E3 リガーゼの探索	
b. E3 リガーゼ STUB1 による RUNX1 の制御	
b1. STUB1 は RUNX1 のユビキチン化及び分解を誘導する	
b2. STUB1 は RUNX1 の局在変化及び転写活性能を阻害する	
b3. STUB1 は RUNX1-RUNX1T1 のユビキチン化及び分解を誘導する	
b4. STUB1 は RUNX1-RUNX1T1 白血病細胞株の増殖を抑制する	
c. E3 リガーゼ DTX2 による RUNX1 の制御	
c1. DTX2 は RUNX1 のユビキチン化及び核外移行を誘導する	
c2. DTX2 は RUNX1 の転写活性能及び分化誘導能を阻害する	
c3. DTX2 による RUNX1 のユビキチン化は RUNX1 のアセチル化と拮抗する	
c4. DTX2 は RUNX1 依存性白血病細胞株の増殖を抑制する	
d. E3 リガーゼ RNF38 による RUNX1 の制御	
d1. RNF38 は RUNX1 のユビキチン化及び安定化を促進する	
d2. RNF38 は RUNX1 の転写抑制能及び分化誘導能を助長する	
考察	p 55-56

### 第三章 RUNX1 のユビキチン化修飾機構を利用した治療応用 P 57-82

要旨	p 58
序論	p 59
実験材料及び方法	p 60-61
結論	p 62-79
a. 化合物探索に向けた戦略及び概要	
b. RUNX1 及び STUB1 タンパク質の精製	
b1. 大腸菌による RUNX1 及び STUB1 タンパク質発現及び精製	
b2. ゲル濾過 (サイズ排除) クロマトグラフィーによるタンパク質精製	
c. ドッキングシミュレーションによるスクリーニング化合物の同定	
d. サーマルシフトアッセイを用いた化合物スクリーニング	
考察	p 80-82

### 第四章 RUNX1-CBFB 結合阻害剤の開発 P 83-104

要旨	p 84
序論	p 85
実験材料及び方法	p 86-88
結論	p 89-101
a. AlphaScreen を用いた、RUNX1-CBFB 結合阻害剤の探索	
b. RUNX1-CBFB 結合阻害剤の細胞内薬効の検討	
b1. Compound A は RUNX1 依存性細胞株の増殖を抑制する	
b2. Compound A は RUNX1 タンパク質の不安定化を誘導する	
b3. Compound A は RUNX1 の転写活性能を阻害する	
b4. Compound A は RUNX1 依存性細胞株のアポトーシスを誘導する	
c. Compound A の物性の検討	
c1. Compound A の類縁体による RUNX1 依存性細胞株の増殖抑制能の検討	
c2. Compound A と RUNX1 又は CBFB との結合強度の検討	
考察	p 102-104

### 第五章 結言 P 105-122

終わりに	p106-107
謝辞	p108-111
引用文献	p112-123

# 第一章

## 諸言

## はじめに

本研究で標的としている転写因子 Runt related transcription factor 1 (RUNX1) は、RUNX1, 2 及び 3 より構成される RUNX ファミリーに属する (Ito *et al* 2015)。RUNX1 遺伝子はヒトでは 21 番染色体上に位置し、RUNX1a-c の 3 つアイソフォームから構成される (Levanon *et al* 2001 and Osato *et al* 2014)。RUNX1 は共役因子 Core Binding Factor B (CBFB) と二量体を形成することが知られており、CBFB は RUNX1 の安定性及び DNA への結合能を高め転写因子としての機能を亢進する (Crute *et al* 1996, Gu *et al* 2000 and Zhang *et al* 1996)。また、RUNX1 の機能及び活性は、翻訳後修飾により精巧に制御されていることが報告されている (Goyama *et al* 2015)。さらに、正常造血において RUNX1 は造血幹細胞の発生及び分化に寄与することが知られており、造血系で重要な役割を担っている (Chen *et al* 2009 and Link *et al* 2010)。一方、造血器腫瘍において RUNX1 は急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia / AML) で多くの変位を認める為、別名 Acute Myeloid Leukemia 1 (AML1) とも呼ばれている (Miyoshi *et al* 1991)。また、染色体 8 及び 21 番点座転座によって生じる融合遺伝子 RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO, AML1-MTG8) は、急性骨髄性白血病において約 10% の遺伝子変異を認める (Grimwade *et al* 2016, Lookk *et al* 1997 and Miyoshi *et al* 1991)。さらに、RUNX1 の異常はリンパ球性白血病や固形腫瘍でも報告があり (Banerji *et al* 2012 and Grossmann *et al* 2011)、元来多くの腫瘍において癌抑制遺伝子として考えられている。しかしその一方で、多くの造血器腫瘍細胞株や造血器腫瘍モデルマウスにおいて RUNX1 の活性を低下させることは、腫瘍細胞株の増殖抑制やモデルマウスの生存期間延長に寄与することが近年報告されている (Goyama *et al* 2013 and Morita *et al* 2017)。したがって現在では、RUNX1 は癌抑制遺伝子としての側面を持つ一方で、腫瘍形成後の環境下において RUNX1 は治療標的になりうると考えられている。

以上述べたように、正常造血及び造血器腫瘍の双方において RUNX1 は非常に重要な役割を果たしており、これまで多くの先行研究がなされてきた。

## RUNX1 及び CBFB との関係

RUNX ファミリーは Runt ドメインと呼ばれる CBFB 及び DNA 結合領域を保有する。RUNX1 の Runt ドメインは protein 53 (p53), Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) 及び Signal Transducers and Activator of Transcription 1 (STAT1) 等が保有する免疫グロブリンフォ

ールドと呼ばれる構造を持ち、実際には Runt ドメイン内の免疫グロブリンフォールドが DNA に結合する(Rudolph *et al* 2001)。また、他の免疫グロブリンフォールドを持つタンパク質とは異なり、Runt ドメインはフォールド内の C 末端領域が直接 DNA に結合する。RUNX1 の点変異を持つ患者検体の多くは、Runt ドメインの C 末端側に変異が存在し、DNA 及び CFBF の結合能の変化が疾患を誘発する原因だと考えられる。また共役因子である CFBF は DNA に結合することなく、Runt ドメインに結合

図 1-1

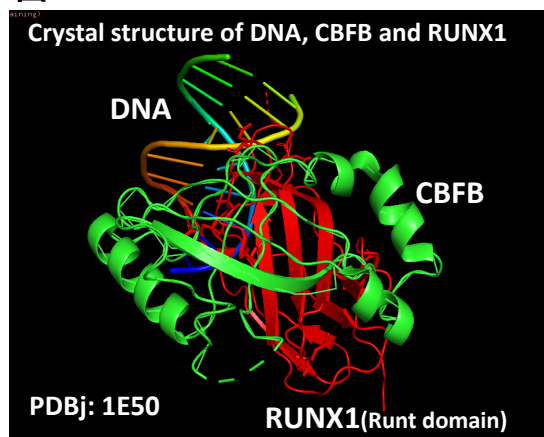


図 1-1  
RUNX1-CFBF-DNA の共結晶  
(Warren *et al* 2000)

し (Bravo *et al* 2001 and Tahirov *et al* 2001) RUNX1 の安定性、DNA 結合能及び転写活性を補助する (Crute *et al* 1996, Gu *et al* 2000, Warren *et al* 2000 and Zhang *et al* 1996) (図 1-1)。標的遺伝子としては、活性化遺伝子として *The colony stimulating factor1 (CSF1)* (Zhang *et al* 1996) 及び *Specificity protein 1 (SP1)* (Huang *et al* 2008)、抑制遺伝子として *Krüppel Like Factor 1(KLF1)* (Kuvardina *et al* 2015) 及び *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1(CDKN1A)* (Hoi *et al* 2010) 等が知られている。

## RUNX1 の造血発生での役割

造血細胞 (白血球、赤血球及び血小板など) の形成に重要な造血幹細胞は、胎生期に形成される。また、造血発生は、胎生初期に卵黄嚢で起こる一次造血と胎児体内の aorta-gonadomesonephros (AGM) 領域で起こる二次造血に分かれる。一次造血は、胎生期の 7.5 日に起こり主に赤血球を産生する。その後すぐに胎生期の 8.5 日より二次造血に置き換わり、胎生期の 10.5 日あたりから血管内皮細胞から剥がれ落ちるように、造血幹細胞が形成される (Bertrand *et al* 2009)。一般的にこの過程を、内皮造血転換 : Endothelial to Hematopoietic transition (EHT) と呼ぶ。Runx1 は主にこの二次造血に必須な転写因子である。Runx1 は、二次造血に

図 1-2 AML1 (RUNX1)  
+/- -/-

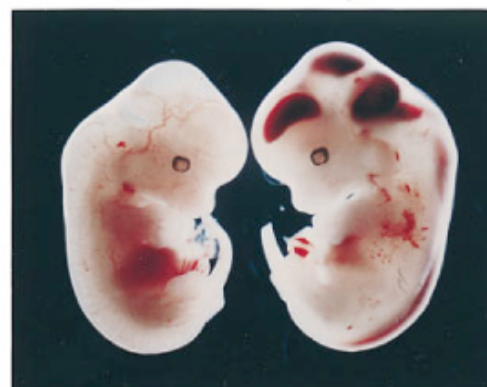


図 1-2  
Runx1 ノックアウトによる胎児出血  
\*-/ =AML1 完全欠失 (Okuda *et al* 1991)

おける血球産生系血管内皮細胞から造血幹細胞が作成される過程において重要な役割を持ち、Runx1 を二次造血期に欠失すると造血幹細胞が血中に産生されなくなる (Chen *et al* 2009 and Lancrin *et al* 2009)。また、Runx1 ノックアウトマウスは胎生期の 12.5 日ごろに、二次造血不全による出血及び血球産生不全により死に至る (Okuda *et al* 1996) (図 1-2)。さらに、Cbfb ノックアウトマウスにおいても同様の表現系を示し死に至り、RUNX1 及び CBFEB の機能協調は二次造血において非常に重要である (Miller *et al* 2002)。

## RUNX1 の正常造血での役割

RUNX1 は造血幹細胞の発生に重要あるとともに、造血幹細胞の分化にも重要な転写因子である。Runx1 のコンディショナルノックアウトマウスの解析により、Runx1 は造血幹細胞が微小環境に局在する際に重要な CXC Chemokine receptor 4 (CXCR4) や  $\alpha$  インテグリンなどの転写調節を正に行うとともに、幹細胞の自己複製能を規定する B cell specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 (BIM1) の発現を負に制御している事が示唆された (Jacob *et al* 2010 and Wang *et al* 2010)。また、マウスの造血幹細胞で *Runx1* 遺伝子を欠失させると造血幹細胞が一時的に増加した後、枯渇することも報告されている。したがって、RUNX1 は造血幹細胞の維持にも深く関わっている。さらに、RUNX1 は造血幹細胞が分化した後の血球細胞にも影響を与えることが知られている (Behrens *et al* 2016 and Kiel *et al* 2005)。造血幹細胞から、骨髓球系前駆細胞、顆粒球及びリンパ球系の分化促進に寄与する (Braun *et al* 2009, Ichikawa *et al* 2004 and Pietras *et al* 2015)。一方、赤血球系への分化は抑制し、巨核球系への分化を促すことも知られている (Kuvardina *et al* 2015, Willcockson *et al* 2019 and Yonezawa *et al* 2018)。このように、RUNX1 は造血幹細胞の発生や発生後の造血幹細胞並びに下流の造血細胞全般の制御に関わる重要な転写因子と言える (図 1-3)。

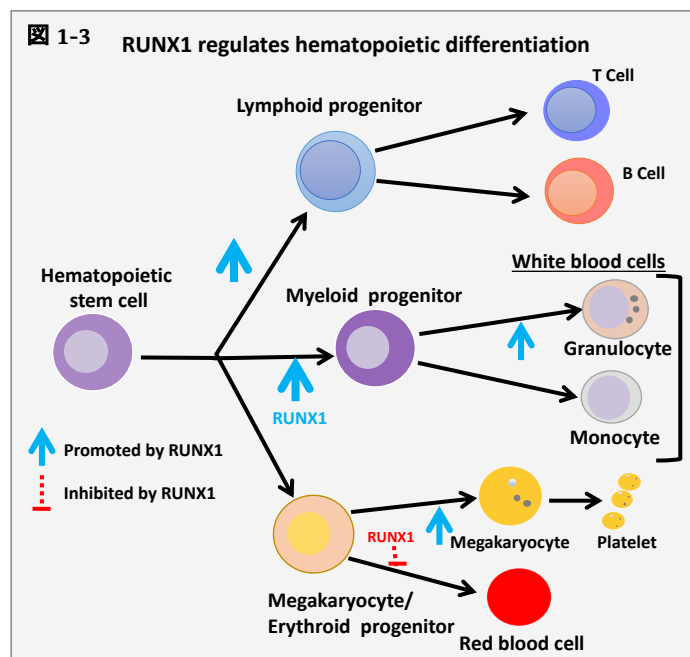


図 1-3  
RUNX1 の主な造血系での制御細胞をまとめた。

## RUNX1 と翻訳後修飾

RUNX1 の活性そのものは、分子レベルでは様々な翻訳後修飾により制御されている。RUNX1 における主な翻訳後修飾機構は、大きく分けてリン酸化、メチル化、アセチル化及びユビキチン化の4つに分類される (Goyama *et al* 2015 and Wang *et al* 2009) (図 1-4)。

RUNX1 のリン酸化は、主に RUNX1 の C 末端側で頻出する。また、RUNX1 のリン酸化は転写抑制因子 SWI-independent3A (SIN3A)、 Histone Deacetylase 1 (HDAC1) 及び HDAC3 と RUNX1 との結合を阻害することにより RUNX1 の転写活性を強める (Imai *et al* 2004, Lutterbach *et al* 2000 and Zhao *et al* 2008)。一方で、 Src Homology region 2 (SHP2) や C-Src との結合による RUNX1 のリン酸化は、RUNX1 の転写共役因子である CBFβ との結合が低下する一方で、クロマチンリモデリング因子 Sucrose Nonfermenting 5 (SNF5) と結合し、RUNX1 は標的遺伝子の転写抑制を行う (Huang *et al* 2012)。このように、RUNX1 のリン酸化は標的遺伝子の転写制御を行っている。

RUNX1 のメチル化は RUNX1 の中心部位で起こり、メチル化転移酵素である Protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) や PRMT4 が結合することにより生じる (Vu *et al* 2013 and Zhao *et al* 2008)。PRMT1 による RUNX1 のメチル化は、転写抑制因子 SIN3A と RUNX1 の結合を解除し RUNX1 の転写活性を高め (Zhao *et al* 2008)。一方で、PRMT4 による RUNX1 のメチル化は、骨髄球系への分化に重要な RUNX1 の標的遺伝子や mir-223 の転写を抑制することが知られており、RUNX1 の機能を抑制する (Vu *et al* 2013)。

RUNX1 のアセチル化は、RUNX1 及びリジンアセチル化トランスフェラーゼファミリーの P300 や Monocytic leukemia Zinc finger protein (MOZ) が協調して行われる。Protein 300 (P300) は、RUNX1 の N 末端側のリジンの 24 及び 43 番に、MOZ は RUNX1 のトランスアクティベーションドメインにアセチル化修飾を行い RUNX1 の

図 1-4

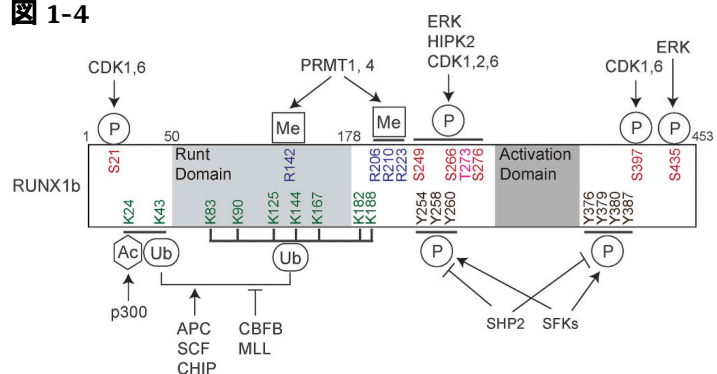


図 1-4

RUNX1 の主な翻訳後修飾部位及び関連タンパク質 (Ac= アセチル化, K=リジン, Me=メチル化, P=リン酸化, R=アルギニン, S=セリン, T=スレオニン, Ub=ユビキチン化) (Goyama *et al* 2015)



DNA 結合能及び転写活性能を高める (Kitabayashi *et al* 2001 and Yamaguchi *et al* 2004)。

RUNX1 のユビキチン化は Runt ドメインの内部及びその近傍にあるリジン残基に対して行われる (Goyama *et al* 2015 and Huang *et al* 2001)。RUNX1 に対するユビキチン化修飾の主な役割は、RUNX1 のユビキチン-プロテアソーム経路を介した分解調節である (Huang *et al* 2011, Shang *et al* 2009 and Yonezawa *et al* 2017)。しかしながら近年の研究により、RUNX1 のユビキチン化はプロテアソーム非依存的分解誘導、RUNX1 自身のアセチル化の減少及び RUNX1 タンパク質の安定化に関わる可能性が示唆された (Yonezawa *et al* 2018 and Yonezawa *et al*. the article under submission)。

## RUNX1 変異による造血器腫瘍の形成

RUNX1 変異は大きく分けて、染色体転座、スプライシングバリエーション及び RUNX1 内の点変異体で大別される (図 1-5)。染色体 8:21 転座により生じる融合遺伝子 *RUNX1-RUNX1T1* は、主な急性骨髄性白血病の原因遺伝子である (Miyoshi *et al* 1991)。RUNX1-RUNX1T1 をヘテロに発現した細胞では、正常の RUNX1 の作用が抑えられ腫瘍形成に関与していると考えられている。例えば、RUNX1-RUNX1T1 は RUNX1 と拮抗して CBFβ と結合することにより、癌抑制遺伝子 *CDKN2A* の遺伝子発現を抑制することで、腫瘍形成を促進すると考えられている (Linggi *et al* 2002 and Yang *et al* 2005)。他にも慢性・急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群で報告されている染色体 3:21 転座により生じる *RUNX1-MDS1 and EV1 Complex Locus protein (MECOM)* 融合遺伝子 (Mitani *et al* 1994 and Nucifora *et al* 1994) や前駆 B 細胞急性リンパ性白血病で報告されている *ETV6 (TEL)-RUNX1* も RUNX1 染色体転座による変異体として造血器腫瘍の原因となる (Golub *et al* 1995)。

また、RUNX1 はスプライシングの違いにより、a, b 及び c の三つのアイソフォームより構成され、RUNX1b が正常の RUNX1 として考えられている。RUNX1a は RUNX1b, c と比較して全長が短く、RUNX1-RUNX1T1 同様、RUNX1 の C 末端側を欠失した形となる。また RUNX1a は、RUNX1b の機能を抑制し腫瘍形成に関わっていると考えられている (Liu *et al* 2009 and Sakurai *et al* 2017)。また、RUNX1c は N 末端が RUNX1a, b と異なり、造血幹細胞の発生及び B 細胞の分化制御に関わっている (Navarro *et al* 2017)。融合遺伝子 *ETV6-RUNX1* は、RUNX1c の N 末端側が欠失しており、B 細胞分化異常を引き起こす事が腫瘍形成の原因だと考えられている (Brady *et al* 2013)。

最後に、RUNX1 の点変異体は、造血幹細胞の異常分化を引き起こす骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndromes/MDS) や AML で高頻度に見つかっている (Harada *et al* 2004 and Imai *et al* 2000)。また、MDS 及び AML の患者検体において RUNX1 の点変異体は、遺伝子発現が喪失するミスセンス変異に関しては比較的 *RUNX1* 遺伝子の広域で起こるが、アミノ酸置換が起こるミスセンス変異は Runt ドメイン内で頻出し、Runt ドメイン内の C 末端側に多い。これらの点変異は、Runt ドメインと DNA 及び CFBF の結合に異常をきたし MDS 及び AML が発症すると考えられている (Forbes *et al* 2015 and Metzeler *et al* 2016)。

図 1-5

30 GRIMWADE *et al*

BLOOD, 7 JANUARY 2016 • VOLUME 127, NUMBER 1

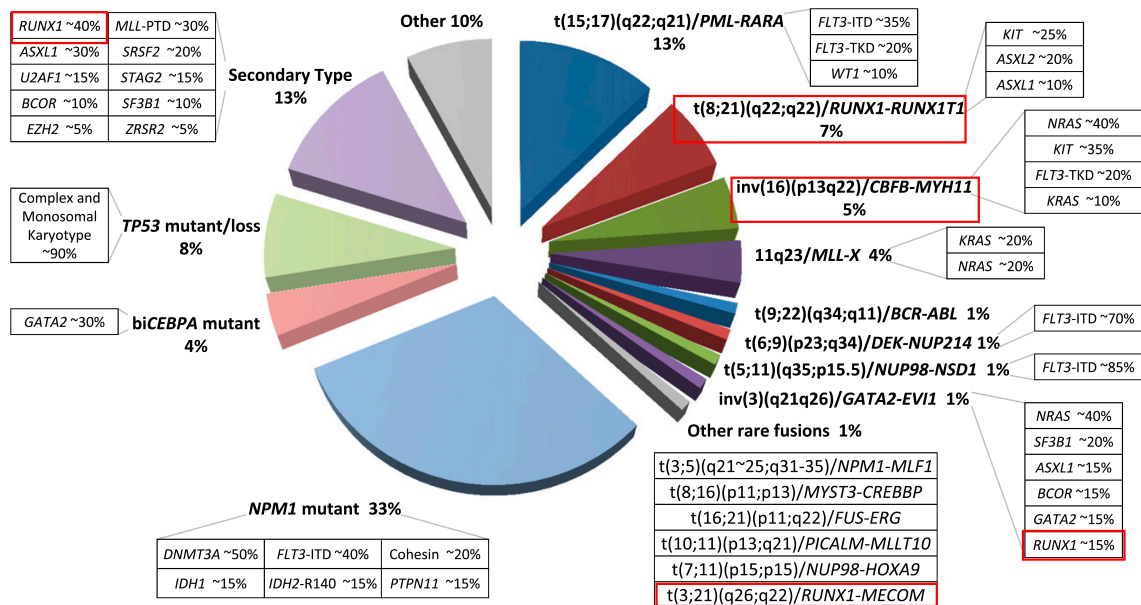


図 1-5 急性骨髄性白血病における遺伝子変異頻度のまとめ。  
\*RUNX1 とその関連変異は赤枠で囲った (Grimwade *et al* 2016)

## RUNX1 阻害による造血器腫瘍抑制効果

RUNX1 変異は、造血器腫瘍の原因になることを前項で説明したが、その一方、正常の RUNX1 が白血病に寄与することが近年報告されている。(Goyama *et al* 2013 and Morita *et al* 2017)。例えば、RUNX1-RUNX1T1 や Mixed Lineage Leukemia (MML)-AF9 保有細胞株や白血病モデルマウスに対して RUNX1 の活性を低下させると、細胞増殖の抑制並びに生存期間の延長が見られた (Goyama *et al* 2013 and Morita *et al* 2017)。さらに、白血病幹細胞の維持に RUNX1 が重要であるという報告もある (Wesely *et al* 2020)。また、RUNX1 変異のない造血器腫瘍細胞株 (TF-1 や Jurkat 細胞) に対して *RUNX1* の遺伝子レベルでの欠失

を行うと細胞の増殖が抑制された (Goyama *et al* 2019)。以上の先行研究より、RUNX1 は腫瘍の形成促進及び維持にも関わっていると考えられる。したがって、RUNX1 変異の有無に関わらず、複数種の造血器腫瘍において RUNX1 は有望な治療標的となりうる。

## 本研究の目的

以上述べたとおり、RUNX1 は複数種の白血病患者において変異が認められた為、癌抑制遺伝子として元来考えられている。一方で、複数種の造血器腫瘍細胞株やモデルマウスにおいて RUNX1 の活性を低下させることは、細胞増殖の抑制や生存期間の延長を認める。したがって、RUNX1 の不活化は多くの造血器腫瘍に対して有効な治療標的となりうる。このような研究背景より、RUNX1 阻害剤の開発もこれまで行われてきた (Cunningham *et al* 2012, Illendula *et al* 2016 and Morita *et al* 2017)。しかしながら、転写因子 RUNX1 は核内で複合体を形成して働く為阻害剤の開発が難しく、現在まで、承認に至り臨床の現場に届いた有効な治療薬は存在しない。そこで、本研究では RUNX1 のような“undruggable”なタンパク質を標的とした治療薬開発のために、RUNX1 の翻訳後修飾の一つであるユビキチン化に着目した。近年、undruggable な因子のユビキチン化を誘導し、分解を促す低分子化合物が注目されている (Ito *et al* 2010 and Krönke *et al* 2014)。しかしながら、RUNX1 のユビキチン化修飾機構はこれまで詳細に解明されてこなかった。そこで、本研究ではこれまで詳細に解析されてこなかった、RUNX1 のユビキチン化修飾機構の解明に取り組んだ。さらに、RUNX1 のユビキチン化修飾機構を応用した RUNX1 分解誘導剤や RUNX1 との結合共役因子である CBFβ との結合阻害剤の開発にも取り組んだ。

したがって、本研究の目的は RUNX1 の不活化を目指した RUNX1 のユビキチン化修飾機構の解明並びに RUNX1 のユビキチン化修飾機構や共役因子 CBFβ との制御機構に着目した RUNX1 阻害剤の開発を行い、最終的に臨床の現場に RUNX1 阻害剤を届けることである。

## 第二章

# RUNX1 のユビキチン化修飾機構の解明

1. The STUB1 research was originally published in the Journal of Biological Chemistry. Yonezawa T, Takahashi H, Shikata S, Liu X, Tamura M, Asada S, Fukushima T, Fukuyama T, Tanaka Y, Sawasaki T, Kitamura T, Goyama S, The Ubiquitin Ligase STUB1 Regulates Stability and Activity of RUNX1 and RUNX1-RUNX1T1, 292(30): 12528-12541 (2017).
2. The RNF38 research was originally published in the *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Yonezawa T, Takahashi H, Shikata S, Sawasaki T, Kitamura T, Goyama S, The Ubiquitin Ligase RNF38 Promotes RUNX1 Ubiquitination and Enhances RUNX1-Mediated Suppression of Erythroid Transcription Program. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505(3): 905-909 (2018).

## 要旨

転写因子 RUNX1 の活性は、主に翻訳後修飾のリン酸化、メチル化、アセチル化及びユビキチン化により制御されている。特に、RUNX1 のユビキチン化修飾は、ユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解に関与することが報告されていたが、RUNX1 の分解を誘導するユビキチンリガーゼ (E3 リガーゼ) が何であるかを含め、詳細な解析は行われていなかった。E3 リガーゼによる基質タンパク質のユビキチン化には、E3 リガーゼと基質タンパク質の相互作用が重要であることから、本章ではまず、RUNX1 と相互作用する E3 リガーゼの同定を試みた。具体的な手法としては、コムギ出芽胚を用いた無細胞タンパク質合成系及びタンパク質間相互作用を検出する“AlphaScreen”を用いた。さらに、“AlphaScreen”により同定した相互作用能の高い E3 リガーゼを用いて RUNX1 に対するユビキチン化誘導能を検討したところ、3つの E3 リガーゼ STUB1, DTX2 及び RNF38 が RUNX1 のユビキチン化を誘導する事を突き止めた。

さらに、RUNX1 のユビキチン化を誘導した 3つの E3 リガーゼが RUNX1 に与える影響を詳細に検討した。まず、STUB1 は RUNX1 及び染色体転座により生じる融合タンパク質 RUNX1-RUNX1T1 のユビキチン化及び分解を誘導することを突き止めた。また、DTX2 は RUNX1 の分解は誘導しなかったが RUNX1 自身の活性に重要なアセチル化と DTX2 によるユビキチン化が競合することにより、RUNX1 の転写活性を減弱させることを突き止めた。興味深いことに、DTX2 は RUNX1-RUNX1T1 の相互作用及びユビキチン化は確認できなかった。さらに、STUB1 又は DTX2 を RUNX1 依存性細胞株にレトロウィルスベクターを用いて遺伝子導入しタンパク質発現を増強させると、RUNX1 依存性細胞株の増殖が抑制されることを見出した。その一方で、RNF38 は RUNX1 のユビキチン化を介して RUNX1 の安定性を高め、RUNX1 が持つ分化誘導能を増強させる事を見出した。

以上のように、本章では RUNX1 のユビキチン化修飾に着目し、その機構を詳細に解析した。その結果、複数の E3 リガーゼが RUNX1 のユビキチン化を誘導することを突き止め、さらに、それぞれの E3 リガーゼは RUNX1 に異なる影響を与える事を見出した。また、STUB1 及び DTX2 の活性化は RUNX1 依存性造血器腫瘍の増殖を抑制するため、これら腫瘍に対する有効な治療戦略になると考えられる。

## 序論

造血細胞の発生及び分化に重要な転写因子 RUNX1 の機能は、翻訳後修飾により精巧に制御されている (Goyama *et al* 2015)。その中でも RUNX1 のユビキチン化は、主にユビキチンプロテアソーム経路による分解に関与する事が報告されている (Huang *et al* 2011 and Shang *et al* 2009)。また、RUNX1 は Runt ドメインと呼ばれる DNA 及び共役因子 CBFβ との結合領域を保有し、その内部及び近傍にユビキチン化修飾を受けるリジン残基を保有する (Goyama *et al* 2015 and Huang *et al* 2001)。また、先行研究より RUNX1 の分解を制御する因子に関しても複数の報告がされてきた。例えば、ヒストンメチルトランスフェラーゼである MLL は、CBFβ と RUNX1 の Runt ドメインに結合する事で RUNX1 のポリユビキチン化を減弱させ、RUNX1 のタンパク質分解を阻害することが報告されている (Huang *et al* 2001 and Huang *et al* 2011)。また、APC-SCF 複合体は細胞周期及び RUNX1 のリン酸化依存的に RUNX1 の分解を誘導することが報告されている (Biggs *et al* 2006)。さらに、マウス E3 リガーゼ Stip1 homology and U-Box containing 1 (Stub1/Chip) は Runx1 及び Runx2 の分解に関与し (Shang *et al* 2008 and Li *et al* 2009)、E3 リガーゼ WWP1 及び NEED4 は、RUNX1 ファミリーのユビキチン化を促進するという報告がある (Jones *et al* 2006 and Chen *et al* 2007)。しかしながらこれまで、内因性レベルで RUNX1 の安定性及び活性を制御する E3 リガーゼに関して詳細な解析は行われてこなかった。

また、急性骨髄性白血病の主な融合タンパク質である RUNX1-RUNX1T1 (RUNX1-ETO, RUNX1-MTG8) は、RUNX1 の N 末端から 177 アミノ酸と RUNX1T1 の融合タンパク質からなる (Miyoshi *et al* 1991)。RUNX1-RUNX1T1 は、他の成長因子の変異体とともに癌抑制遺伝子の活性を落とし、造血幹細胞の自己複製能及び白血病化を促進する (Goyama *et al* 2011, Linggi *et al* 2002 and Lin *et al* 2017)。また、RUNX1 同様、RUNX1-RUNX1T1 に関するユビキチン化修飾機構もほとんど解明されていない。先行研究において、RUNX1-RUNX1T1 は E2 エンザイム UbcH8 と E3 リガーゼ SIAH1 を組み合わせる事で分解を促進するという報告があるのみである (Kramer *et al* 2008)。また、RUNX1 のユビキチン化に関与する Runt ドメイン内部及び近傍の 9 つのリジン残基のうち 7 つは、RUNX1-RUNX1T1 でも保有されており、RUNX1-RUNX1T1 融合タンパク質も RUNX1 と同様のメカニズムでユビキチン化修飾を受け分解されることが予測される (図 2-1)。

図 2-1

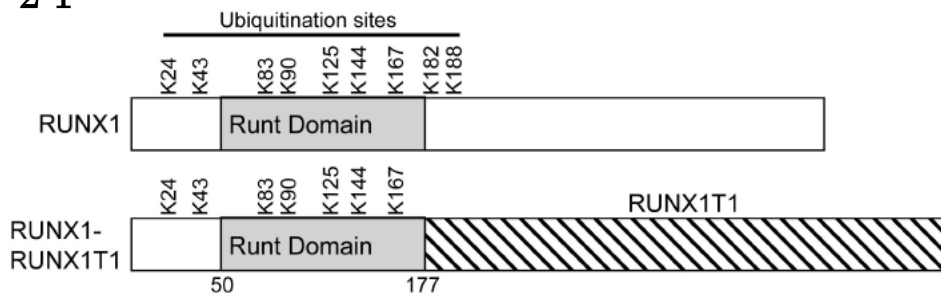


図 2-1

### RUNX1 及び RUNX1-RUNX1T1 のユビキチン化修飾部位

RUNX1-RUNX1T1 は N 末端より 177 アミノ酸を RUNX1 と同様に保有している一方、残りの大半は RUNX1T1 が占めている。図の数字は、N 末端からのアミノ酸残基を示しており、Runt ドメインは DNA 及び CBFβ の結合領域である。RUNX1 の 9 個のリジン (K) 残基のうち 7 個は RUNX1-RUNX1T1 においても保存されている。

しかしながら、RUNX1 同様に細胞内では他の共役因子と精巧に制御されている等を理由に、責任 E3 リガーゼに関する詳細な研究はこれまで行われていなかった。そこでまず本研究では、精製度の高いコムギ無細胞タンパク質合成系 (Harbers *et al* 2014) 及びタンパク質相互作用能を検討する “AlphaScreen” を駆使して (Takahashi *et al* 2009 and 2016)、RUNX1 と相互作用する E3 リガーゼを同定した。さらに、RUNX1 と相互作用する E3 リガーゼに対して、RUNX1 に及ぼす影響を詳細に検討した。

## 実験材料及び方法

### (1) 使用プラスミド

一過性の RUNX1b の発現のために、Myc-又は FLAG-RUNX1b を pCDNA3 又は pCMV2 ベクターに導入した。また、レトロウィルスベクターを用いた実験には、pMYs-Ires (I) GFP (G) 又は NGF Receptor (R) に RUNX1b を導入した。RUNX1 のユビキチン化修飾サイトであるリジン残基をアルギニン残基に置換した RUNX1-K24/43R 変異体の作成には、QuikChange Lightning Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を使用した。また、作成した変異体は、pMYs-IG 又は pCDNA3 ベクターに同導入して使用した。

一過性の STUB1 又は STUB1K30A 変異体の発現のために、Myc-又は FLAG-STUB1 又は K30A を pCDNA3 に導入した。また、レトロウィルスベクターを用いた実験には pMYs-IG ベクターに導入して使用した。一過性の DTX2 又は DTX2  $\Delta$ R 変異体の発現のために、HA-又は FLAG-DTX2 又は  $\Delta$ R を pCDNA3 に導入した。また、レトロウィルスベクターを用いた実験には、pMYs-IG ベクターに導入して使用した。

一過性の RNF38 発現のために、RNF38 を pCDNA3 に導入した。また、レトロウィルスベクターを用いた実験には、pMYs-IG ベクターに導入して使用した。HA-, Myc- 及び FLAG-ユビキチンは、pCMV2 ベクターに導入した。pMCSFR-luc 及び pCMV5-CBFB は、Addgene より入手した。RUNX1-RUNX1T1 及び RUNX1 の C 末端欠失変異体 (S291fsX9) の発現は、pMYs-IG ベクターに導入して使用した。またコムギ無細胞タンパク質合成系における 287 種類の E3 リガーゼは、pEU-FLAG ベクターに導入して使用した。また、RUNX1 及び CBFB は、pEU-FLAG 又は bls ベクターに導入して使用した。

### (2) コムギ無細胞タンパク質合成系及び AlphaScreen を用いた相互作用アッセイ

287 種類の E3 リガーゼタンパク質アレイは、the robotic synthesizer Gen-Decoder 1000 (Cell Free Science, Yokohama, Japan) を使用し合成した (Takahashi *et al* 2009 and 2016)。RUNX1 及び CBFB の抽出のために 22,000×g で 10 分間遠心し、上清と沈殿物を分離した。また、その抽出物を SDS-PAGE で処理した後、合成タンパク質をウェスタンブロッティングで検出した。FLAG タグの検出には、horseradish peroxidase (HRP) 混合 anti-FLAG 抗体 (M2, SIGMA) を用い、biotin タグの検出には anti-biotin 抗体 (BN-34, Sigma) を用いた。RUNX1 を可溶化するオリゴヌクレオチドとして、AGATGTGTGGTTAACCAAAAC 及び



AGGTTTGTGGTTAACCACACAT を使用した。ビオチン化 RUNX1 及び 287 種類の FLAG タグが付加された E3 リガーゼの無細胞系における相互作用は、AlphaScreen technology (PerkinElmer Life Sciences) を用いて検出した (Takahashi *et al* 2009 and 2016)。

### (3) 細胞培養

ヒト臍帯血は、Riken BRC 又は日本赤十字社 関東甲信越 臍帯血バンクより入手した (東京、日本)。CD34 陽性細胞は、CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec) を用いて分離した。また、レトロウィルスを用いることにより CD34 陽性ヒト臍帯血細胞に RUNX1-RUNX1T1 を導入し、RUNX1-RUNX1T1 発現細胞を作製した (Mulloy *et al* 2002, Mulloy *et al* 2003 and Goyama *et al* 2016)。ヒト臍帯血細胞及びそれら細胞に RUNX1-RUNX1T1 を導入した細胞は、StemSpan™ SFEM II (STEMCELL Technologies) 中に [10 ng/ml (human SCF, human TPO, human IL-3, human IL-6, murine FLT3L)] (R & D systems) を添加して培養した。K562、Kasumi-1、THP1、HEL 及び HL-60 細胞は、RPMI-1640 と 10% fetal bovine serum (FBS) 及び 1% ペニシリン-ストレプトマイシン環境下で、SKNO-1 細胞及び TF-1 は、RPMI-1640 と 10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン及び 1 ng/mL human GM-CSF (R and D systems) 環境下で培養した。

### (4) トランスフェクション/ウェスタンブロッティング/共免疫沈降法

Human Embryonic Kidney cells 293 (HEK293 T / 293T) 細胞に、3 µg の標的遺伝子発現ベクター又はコントロールベクターを 30 µl のポリエチレンジイミン及び 600 µl の OptiMEM (Thermo Fisher) 混合溶液に加え細胞培養液中に添加した。細胞は遺伝子導入 48 時間後に、Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; Catalog Number 9803) を用いて回収した。共免疫沈降法は、anti-[Myc 9E10 (Santa Cruz Biotechnology, sc-40)、FLAG (SIGMA, F3165)、HA (Roche, 12CA5) 又は RUNX1 (Cell signaling Technology, Catalog Number 4336)] 抗体を用いて 4°C で 30 分間攪拌した後、サンプルに Dynabeads Protein-G (Thermo Fisher Scientific, USA) を加え、さらに 4 °C で 30 分間攪拌した。免疫沈降後は、サンプルを 1 mM のフェニルメタンスルホニルフルオリドを含む Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; Catalog Number 9803) で 3 回洗浄した。その後、サンプルを SDS-PAGE で泳動しウェスタンブロッティングを行った。ウェスタンブロッティングで使用する抗体は以下の通りで、

Anti-[FLAG M2-Peroxidase (Sigma, A8592)、Myc 9E10 (Santa Cruz Biotechnology, sc-40)、anti-HA-Peroxidase (Roche, 12CA5)、RUNX1 (Cell signaling Technology, Catalog Number 4336)、STUB1 (Cell Signaling Technology, Catalog Number 2080)、DTX2 (NOVUS, NBP2-13941, Lamin (Santa Cruz Biotechnology, B1304)、GAPDH (Cell Signaling Technology, Catalog Number 5174) Ubiquitin (Cell Signaling Technology, P4D1, Catalog Number 3936) 及び Tubulin (Sigma, T5168)] 抗体を用いた。シグナルの発光には、SuperSignal West Pico (Pierce, Rockford, IL, USA)、バンドの検出には、LAS-4000 Luminescent Image Analyzer (FUJIFILM)、バンドの発光強度の測定には、LabWorks Version 4.5 software (UVP, LLC) を使用した。

#### (5) (核・細胞質) 画分抽出

細胞を回収後、ハイポトニックバッファー [(10 mM HEPES、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM KCl、0.5 mM DDT、0.1% TritonX-100 及び protease inhibitor cocktail)] を加え、4°C で 20 分培養した後、8000 rpm で 5 分遠心し上清を細胞質画分のタンパク質溶液として回収した。次に、沈殿物にライシスバッファー [0.5 % NP-40、protease inhibitor cocktail (Sigma)、及び Benzonase (Sigma)] を加え、4°C で 35 分培養した後、8000 rpm で 30 分し上清を核画分として回収した。

#### (6) 間接蛍光抗体法

293T 細胞に標的遺伝子を導入し、48 時間後に 4%パラホルムアルデヒドを加えオルガネラを固定した。また、0.2%Triotn X-100 を加え細胞を透過処理した後、2%BSA 及び 5%ヤギ血清を用いてブロッキングした。その後、[anti-RUNX1 (Abcam, ab92336)、anti-FLAG (Sigma, F3165 or F7425) 及び anti-HA (Bio Legend, Catalog Number 901513)] 抗体を一次抗体として、Alexa Fluor 568-conjugated anti-rabbit 又は-mouse 抗体 (Thermo Fisher, A11011 or A11030) 及び Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit or -mouse 抗体 (Thermo Fisher, A11029 or A11034) を二次抗体として蛍光標識した。

K562 又は Jurkat 細胞に標的遺伝子を導入し、48 時間後に 4% パラホルムアルデヒドを加えオルガネラを固定した。また、0.2 % Triotn X-100 を加え細胞を透過処理した後、2 % BSA 及び 5%ヤギ血清を用いてブロッキングをした。その後、 [anti-RUNX1 (Abcam, ab92336)、 anti-FLAG (Sigma, F3165)、anti-HA (Bio Legend, Catalog Number 901513)]

抗体を一次抗体として、Alexa Fluor 568-conjugated anti-rabbit 抗体 (Thermo Fisher, A11011) 及び Alexa Fluor 633-conjugated anti-mouse 抗体 (Thermo Fisher, A21050) を二次抗体として蛍光標識した。上記の実験において、核染色に DAPI (Bio Legend) を用いた。蛍光染色サンプルの解析には、confocal microscope (Nikon A1) 又は super-resolution microscope (Nikon SIM) を使用した。新規タンパク合成阻害剤 Mg-132 は、20  $\mu$ M 加え実験に使用した。

#### (7) フローサイトメトリー解析

細胞の解析には、FACS Verse 及び細胞のソートには FACS Aria (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を使用した。また、NGFR 及び CD235a の検出には、anti-NGFR-PE (Biolegend, H12649) 及び anti-CD235a-APC (Biolegend, ME 20.4) を利用した。

#### (8) レポーターアッセイ (ルシフェラーゼアッセイ)

293T 細胞を 24 ウェルプレートに 10 万個撒き 24 時間後、500 ng の pMCSFR-luc (Zhang *et al* 1996) 又は pKLF1 (Kuvardina *et al* 2015) とその他実験で使用する遺伝子を 100 ng ポリエチレンイミンを用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 48 時間後細胞を回収し、the luciferase assay system (Promega) 及び a luminometer (BMG LABTECH, FLUOstar OPTIMA) を用いてルシフェラーゼ活性を解析した。実験誤差の正規化には、500 ng の GFP 発現ベクター (pMYs-IG) を他のプラスミドと同時に遺伝子導入し、GFP 陽性細胞の割合から転写効率を導き出し行った (Dandekar *et al* 2005)。

#### (9) レトロウイルス形質導入

リン酸カルシウム法によりレトロウイルスベクターを 293T 細胞に一過性に発現させ、レトロウイルスを作製した (Morita *et al* 2000)。作製したレトロウイルスの細胞への導入には、レトロネクチン (Takara Bio Inc, Otsu, Shiga, Japan) を使用した。

#### (10) CRISPR/Cas9 システムを用いた STUB1 又は DTX2 欠失誘導

STUB1 を標的とした gRNA は、オリゴヌクレオチド [gRNA-1 FW: CACCGGGCCGTGTATTACACCAACC /RV: AAACGGTTGGTGTAATACACGGCCC、gRNA-2 FW: CACCGGAAGCGCTGGAACAGCATTG /RV: AAACCAATGCTGTTCCAGCGCTTCC (FASMAC, Kanagawa, Japan)] 及び DTX2 を標的とした gRNA はオリゴヌクレオチド [gRNA-1 FW:

CACCGAGCCGTGGCCCGTAATGTTG /RV: AAACCAACATTACGGGCCACGGCTC、  
gRNA-2 FW: CACCGAGTTGGGGTCGGGATAGCCG /RV:  
AAACCGGCTATCCCGACCCCAACTC (FASMAC, Kanagawa, Japan)] を用いた。これら  
ヌクレオチドをアニーリングし、the lentiGuide-Puro: Addgene (Plasmid 52963) ベクター  
にサブクローニングした (Sanjana *et al* 2014)。また、Addgene より Cas9 発現ベクター  
(lentiCas9-Blast, 52962) 及びレンチウイルス発現ベクター [(pMD2.G, 12259) and (psPAX,  
12260)] を入手した。リン酸カルシウム法によりレンチウイルスベクターを 293T 細胞に一  
過性に発現させ、Cas9 及び gRNA のレンチウイルスを作製した。その後、作成したレンチ  
ウイルスを K562、Jurkat 及び Kasumi-1 細胞に感染させて 24 時間後にブラストシジン  
(10 ng/ml) を用いて Cas9 安定発現細胞の、ピューロマイシン (1 ng/ml) を用いて gRNA 安  
定発現細胞のセレクションを行った。最後に、STUB1 及び DTX2 の欠失誘導効率をウェス  
タンブロットティングによって確認した。

## (11) 統計解析

非対応又は両側 t 検定は、ルシフェラーゼアッセイ (レポーターアッセイ) において異なっ  
たグループ間の評価に使用した。Welch's t 検定は、コントロール及び STUB1 欠失細胞にお  
ける RUNX1 と RUNX1-RUNX1T1 の安定性の比較又はベクターコントロール及び STUB1  
導入細胞の増殖能の比較に使用した。

## (12) アセチル化リジンを基質とした免疫沈降法

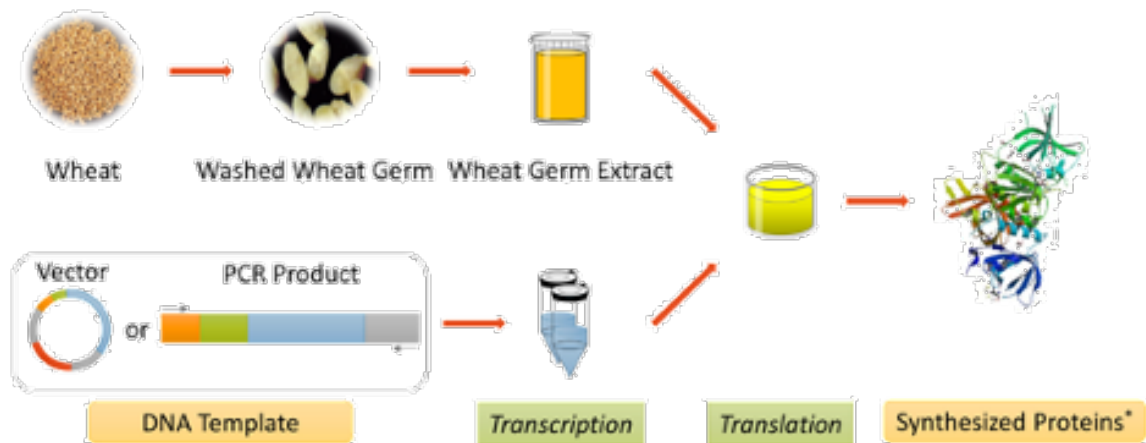
293T 細胞に、3 µg の Myc-RUNX1 又は RUNX1K24/43R 及び HA-DTX2 発現ベクターを  
PEI 法により一過性にトランスフェクションした。また、細胞の回収及び免疫沈降法は、ア  
セチル化リジン結合ビーズを用いて以下の製品のプロトコールに従って行った (Signal-  
Seeker™ Acetyl-Lysine Detection Kit; Cytoskeleton, Inc, Denver, CO, USA)。また、アセ  
チル化リジン及び RUNX1 をウェスタンブロットティングにおいて検出するために、anti-  
RUNX1 (Cell signaling Technology, Catalog Number 4336) and anti-acetyl-lysine-HRP  
(Cytoskeleton, Inc) を用いた。

## 結論

### a. AlphaScreen を用いた RUNX1 と相互作用する E3 リガーゼの探索

基質タンパク質のユビキチン化には、基質タンパク質とユビキチン化リガーゼ (E3 リガーゼ) の相互作用が重要である。そこで本節では、RUNX1 と相互作用する E3 リガーゼの探索を行った。具体的な手法は、コムギ出芽胚を用いた無細胞タンパク質合成系 (図 2-2) (Harbers *et al* 2014) 及びタンパク間相互作用を検出する実験系 “AlphaScreen” を用いた (図 2-3) (Takahashi *et al* 2009 and 2016)。

図 2-2

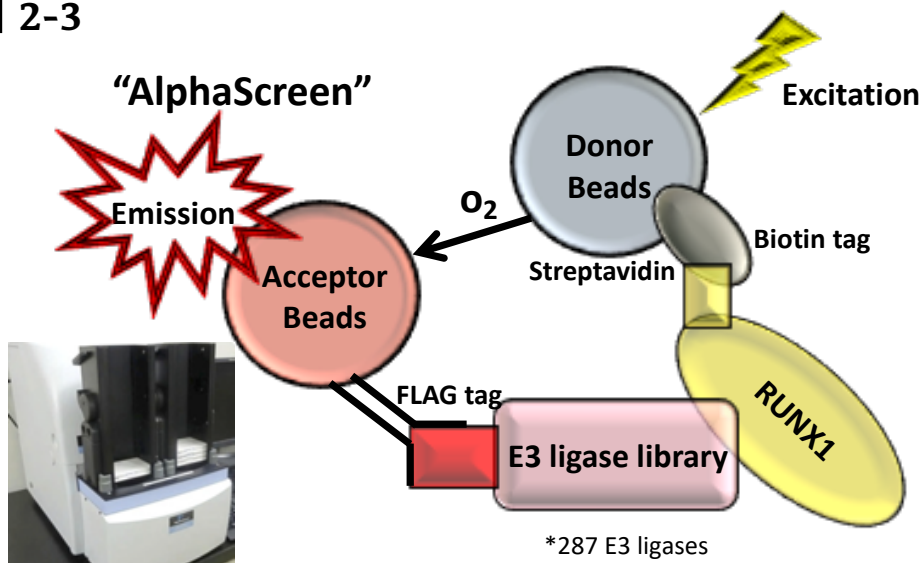


(Harbers *et al* 2014)

図 2-2

コムギ出芽胚を用いた無細胞タンパク質合成系の模式図 (Harbers *et al* 2014)。  
コムギ出芽胚は翻訳因子を多く含む。抽出液に、目的タンパク質の遺伝子をコードしたプラスミド又は PCR 産物を導入し遺伝子の翻訳を行う。

図 2-3



(Takahashi H et al, 2016 PLOS ONE)

図 2-3

“AlphaScreen”を用いた RUNX1 と 287 種類の E3 リガーゼとの相互作用解析の模式図  
RUNX1 にビオチンタグを、E3 リガーゼに FLAG タグを付加した。また、ビオチンはドナービーズを、FLAG はアクセプタービーズを認識する。ドナービーズに励起光を照射した際に、アクセプタービーズの距離が近いほど（相互作用が強い）アクセプタービーズが発光する。

元来、タンパク質精製には原核生物の大腸菌や (kigawa *et al* 2004)、真核生物ではウサギ網状赤血球用血液を酵素源とした無細胞系が用いられてきた (Arnstein *et al* 1964)。前者は、タンパク質の大量培養を可能とする一方で、原核生物と真核生物による翻訳速度や使用コドン頻度の違いなどからタンパク質によっては全長合成が難しい等の欠点がある。また、ウサギ網状赤血球用血液を酵素源とした無細胞系は、真核生物による翻訳と無細胞系で翻訳を行うことにより細胞内の生理的な制約を回避しタンパクを合成できる。一方で、溶血操作により混入するリボヌクレアーゼが mRNA の分解を誘導し、タンパク質の大量合成を行うことに対して課題を残した。そこで本研究では、まず発芽に備えて翻訳因子を大量に貯蔵するコムギ胚芽を用い無細胞系にてタンパク合成を行った。N 末端に FLAG 又はビオチン化タグを付加した RUNX1 及び共役結合因子である CBF B を合成した。CBF B は、上清において検出され可溶性タンパクとして合成されることが分かった (図 2-4 A)。一方、RUNX1 は通常の合成条件では主に不溶性画分において検出されたが、RUNX1 の結合配列を含んだオリゴヌクレオチドを加えることによって可溶性にすることが成功した (図 2-4 B)。以上の結果は、RUNX1 の DNA 結合領域が疎水性に富み、オリゴヌクレオチド非存在下では溶解しづらい性質を持つと推測される。

図 2-4

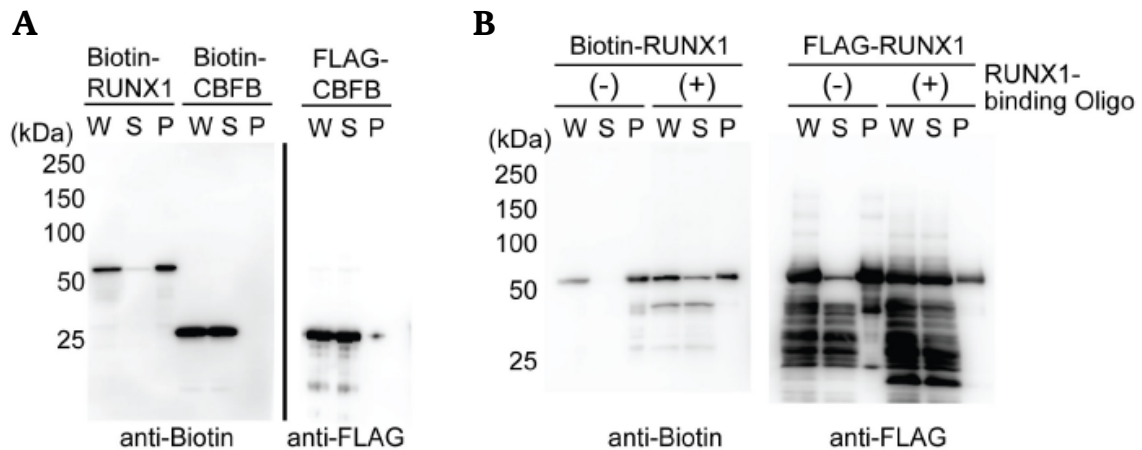


図 2-4

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた RUNX1 及び CBFβ のタンパク質の発現

- A. コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、N 末端に FLAG 又はビオチン化タグを付加させた RUNX1 及び CBFβ を合成した。合成したタンパク質を遠心後、合成産物をそれぞれの画分に分け [全合成産物= the whole translation mixture (W)、上清=supernatant (S)、及び不溶物= insoluble pellet (P)] SDS-PAGE によりサンプルを泳動後、anti-Biotin 又は anti-FLAG 抗体を用いウェスタンブロットティングにより解析を行った。CBFβ は上清、RUNX1 は沈殿物画分において主に検出された。
- B. RUNX1 に結合するオリゴを加え A.と同様の実験を行った。オリゴを加えたことにより、可溶性画分においても RUNX1 タンパク質の発現を認めた。

次に、AlphaScreen を用いて RUNX1 と CBFβ 又は RUNX1 と 287 種類の E3 リガーゼとの相互作用能を検討した。AlphaScreen の蛍光は、ドナー及びアクセプタービーズの相互作用により観察される。ドナービーズとアクセプタービーズが近接した際に、ドナービーズに励起光を照射すると一重項酸素がアクセプタービーズに伝達され発光を示す (Ullman *et al* 1994)。今回は、ストレプトアビジンで標識されたドナービーズを認識するビオチンを RUNX1 に、アクセプタービーズを認識する FLAG タグを CBFβ 又は 287 種類の E3 リガーゼに付け、相互作用能を検討した。その結果、RUNX1 及び CBFβ を反応させたときに生体内同様に RUNX1 と CBFβ の強い相互作用が AlphaScreen のシグナルとして検出された (図 2-5)。この結果は、コムギ無細胞系で合成した RUNX1 タンパク質の相互作用が AlphaScreen により検出可能であることを示している。

図 2-5

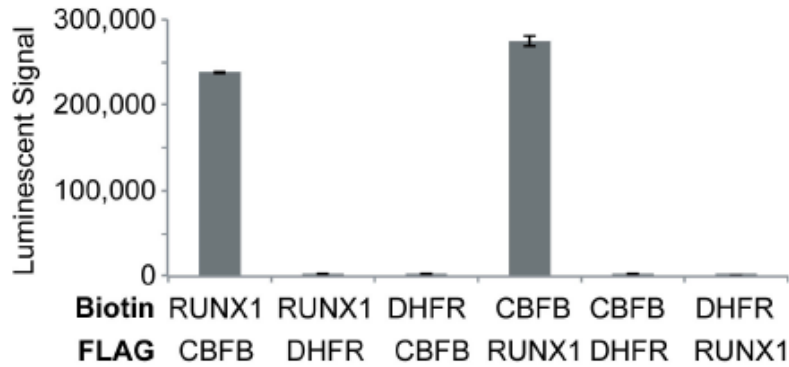


図 2-5

**AlphaScreen を用いた RUNX1 及び CBFB の相互作用検出**

Biotin-又は FLAG-RUNX1 及び Biotin-又は FLAG-CBFB (それぞれ 0.75  $\mu$ L) を全合成産物から抽出し、RUNX1 及び CBFB の相互作用を AlphaScreen により検出した。Biotin-又は FLAG-DHFR は RUNX1 及び CBFB に対する相互作用評価のネガティブコントロールとして用いた。

次に、287 種類の E3 リガーゼと RUNX1 の AlphaScreen による相互作用解析を行った。非特異的結合を評価するためのコントロールとして、本来 E3 リガーゼと相互作用を示さない DHFR と 287 種類の E3 リガーゼの相互作用も検討した。その結果、RUNX1 と E3 リガーゼの結合能が、DHFR より顕著に上昇した 10 つの E3 リガーゼ (WWP1、Rnf38、Rnf44、RNF38、STUB1、DTX2、TRIM5、UHRF2、DZIP3 及び NEDD4) を同定した (図 2-6)。

図 2-6

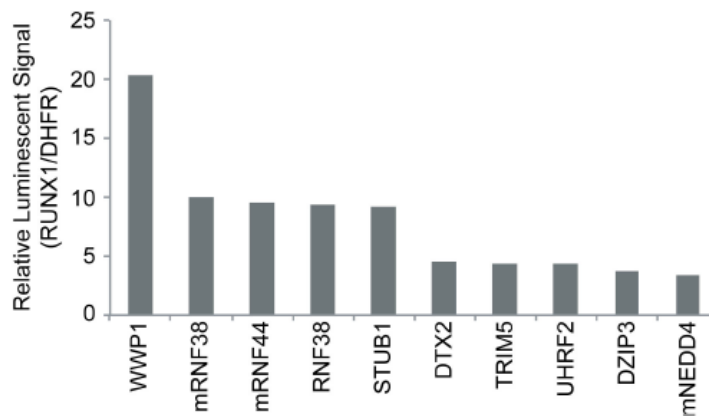


図 2-6

**AlphaScreen による 287 種類の E3 リガーゼと RUNX1 の相互作用解析**

非特異的結合を評価するために、ネガティブコントロールとして DHFR と 287 種類の E3 リガーゼの相互作用も検討した。相互作用能が高かった上位 10 個の E3 リガーゼをデータとして示した(m=murine)。



また、RUNX1 と相互作用の強い E3 リガーゼ上位 10 個に関して、RUNX1 のユビキチン化能を検討した。そして最終的に、E3 リガーゼ STUB1、Deltex2 (DTX2) 及び Ring Finger Protein38 (RNF38) が RUNX1 のユビキチン化を細胞レベルで誘導することを見出した。一方、先行研究において WWP1 及び NEDD4 も RUNX1 の責任 E3 リガーゼとして機能する可能性が示唆されているが、本研究においては、RUNX1 のユビキチン化誘導能は認められなかった。また、これら 3 つの E3 リガーゼ (STUB1, DTX2 及び RNF38) が RUNX1 に対して異なる作用をもたらす事を発見した。次節以降、これら 3 つの E3 リガーゼによる RUNX1 のユビキチン化修飾が、RUNX1 に与える影響に関して詳細に解説していく。

## b. E3 リガーゼ STUB1 による RUNX1 の制御

### b1. STUB1 は RUNX1 のユビキチン化及び分解を誘導する

“AlphaScreen” により同定した RUNX1 結合 E3 リガーゼのうち、STUB1 は生理学的に FOXP3 の分解に誘導することで T 細胞の制御に関わり (Chen *et al* 2013)、分子生物学的に TFEB の制御を介してオートファジーの制御に関わることも報告されている (Sha *et al* 2017)。さらに、STUB1 は RUNX ファミリータンパクと相互作用することが知られている (Shang *et al* 2008 and Li *et al* 2008)。STUB1 は U-box ドメインと Tetratricopeptide Repeat (TPR) ドメインを保有し、U-box ドメインは E2 エンザイムの足場となる。また、TPR ドメイン内にあるリジンの 30 番は Heat Shock Protein 70 (HSP70) との相互作用に重要で、HSP70 は STUB1 のユビキチン化活性を補助することが知られている (図 2-7) (Zhang *et al* 2015)。

図 2-7

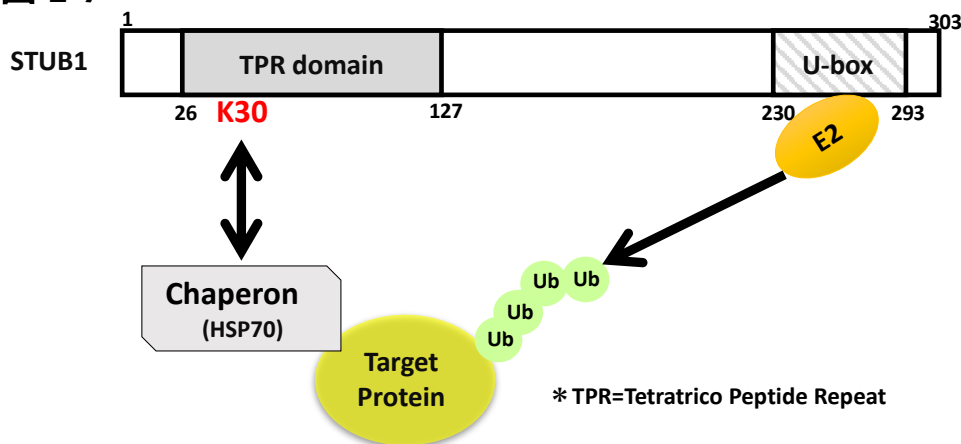


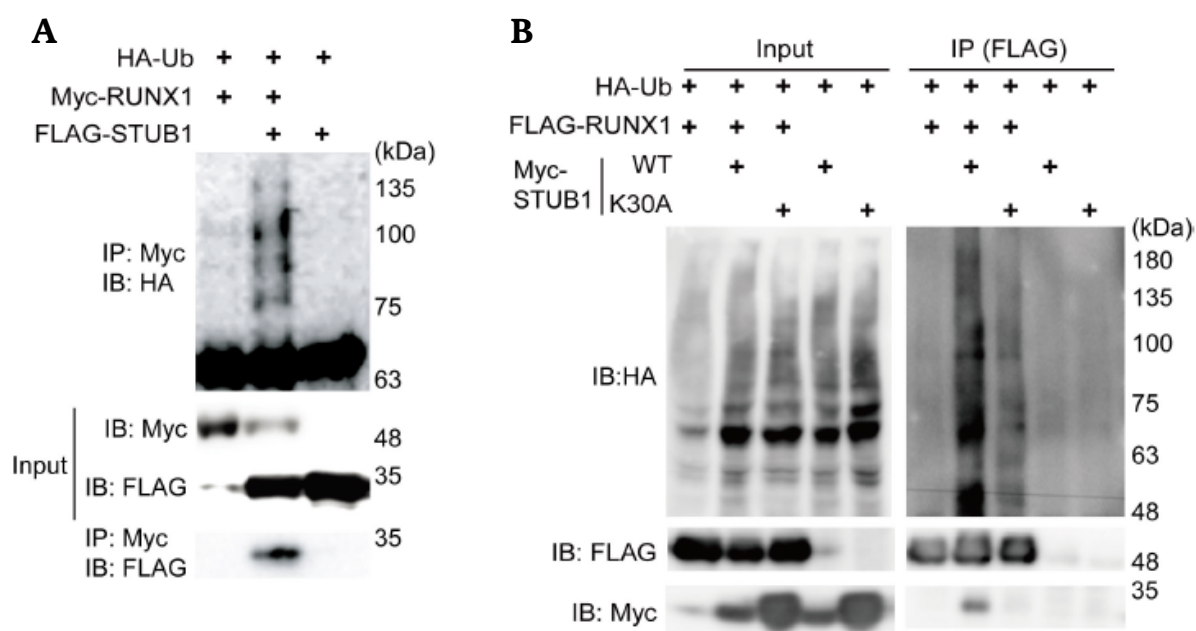
図 2-7

#### E3 リガーゼ STUB1 の模式図

STUB1 は、TPR ドメイン内のリジンの 30 番を介して HSP70 と結合する。また、HSP70 は STUB1 の E3 リガーゼとしての活性を強める。さらに、STUB1 は U-box ドメインを包有し、U-box ドメインは E2 エンザイムと結合する。

そこでまず、STUB1 が細胞内において RUNX1 と相互作用をして、さらにユビキチン化を誘導するかを調べた。293T 細胞に Myc-又は FLAG-RUNX1、HA-ユビキチン、FLAG 又は Myc-STUB1 及び Myc-STUB1K30A (HSP70 との相互作用部位であるリジンの 30 番をアラニンに置換した STUB1-K30A 変異体) を一過性に発現させた。タンパク抽出液を用いて、RUNX1 を基質とした (anti-FLAG 又は anti-Myc 抗体を使用) 共免疫沈降を行い、anti-HA 抗体を用いてユビキチン化 RUNX1 を検出した。その結果、STUB1 は RUNX1 と相互作用し、STUB1 は RUNX1 のユビキチン化及び分解を誘導することを明らかにした。一方、STUB1-K30A 変異体は、野生型 STUB1 と比較すると RUNX1 のユビキチン化及び分解誘導を顕著に示さなかった。以上の結果より、STUB1 が RUNX1 の基質 E3 リガーゼであることが示された (図 2-8 A,B)。

**図 2-8**



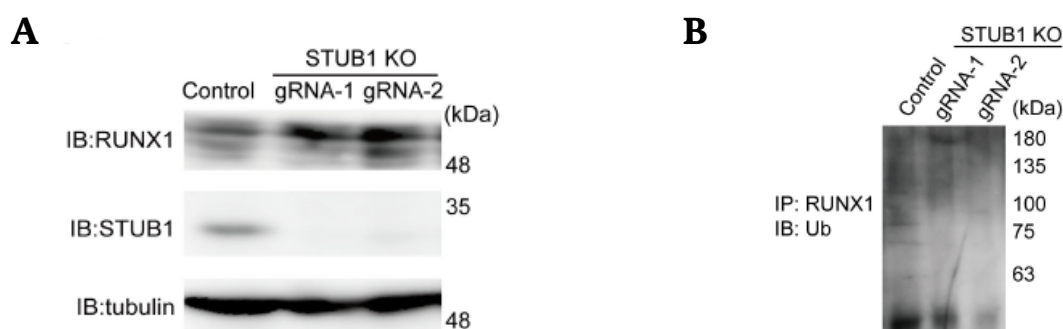
**図 2-8**

**STUB1 による RUNX1 のユビキチン化能の検討**

A,B. 293T 細胞に Myc-又は FLAG-RUNX1、HA-ユビキチン、及び FLAG-又は Myc-STUB1 又は Myc-STUB1-K30A 変異体を一過性に発現させた。タンパク抽出液を、RUNX1 を基質とした (anti-Myc 又は FLAG 抗体を用いて) 共免疫沈降を行い、ユビキチン化 RUNX1 を検出するために、anti-HA 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。STUB1-K30A 変異体は、野生型と比較すると RUNX1 のユビキチン化を顕著に誘導しなかった。

次に、内因性レベルにおいて STUB1 による RUNX1 の安定性を検討した。Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas9) システムを用いて、K562 細胞に Cas9 及び STUB1 を標的とした gRNA を導入し、STUB1 の欠失を誘導した。STUB1 欠失細胞では、RUNX1 のタンパク発現の上昇及びユビキチン化 RUNX1 の減少を認めた (図 2-9 A,B)。

## 図 2-9



**図 2-9**  
STUB1 欠失が RUNX1 のタンパク質発現及びユビキチン化に与える影響の検討

A,B. K562 細胞に、ベクターコントロール及び二つの独立した STUB1 をターゲットとした gRNA を導入した。gRNA の導入により、STUB1 のタンパク質発現は減少し、その結果、RUNX1 のタンパク質発現は上昇し、ユビキチン化 RUNX1 の減少を認めた。

次に、STUB1 の存在の有無が RUNX1 の安定性に影響するかを調べた。STUB1 欠失 K562 細胞又は通常の K562 細胞の培養液中に、新規タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (Cycloheximide/CHX) を添加し、0、2、4、6、8 時間ごとに細胞を回収した。また回収したサンプルの RUNX1 のタンパク質発現量をウェスタンブロッティングにより確認した。その結果、STUB1 欠失時は野生型 STUB1 存在時と比較して RUNX1 のタンパク質レベルでの減少の遅延を認めた (図 2-10)。以上の結果から、STUB1 は内因性レベルにおいても RUNX1 の安定化に寄与していることが示された。

図 2-10

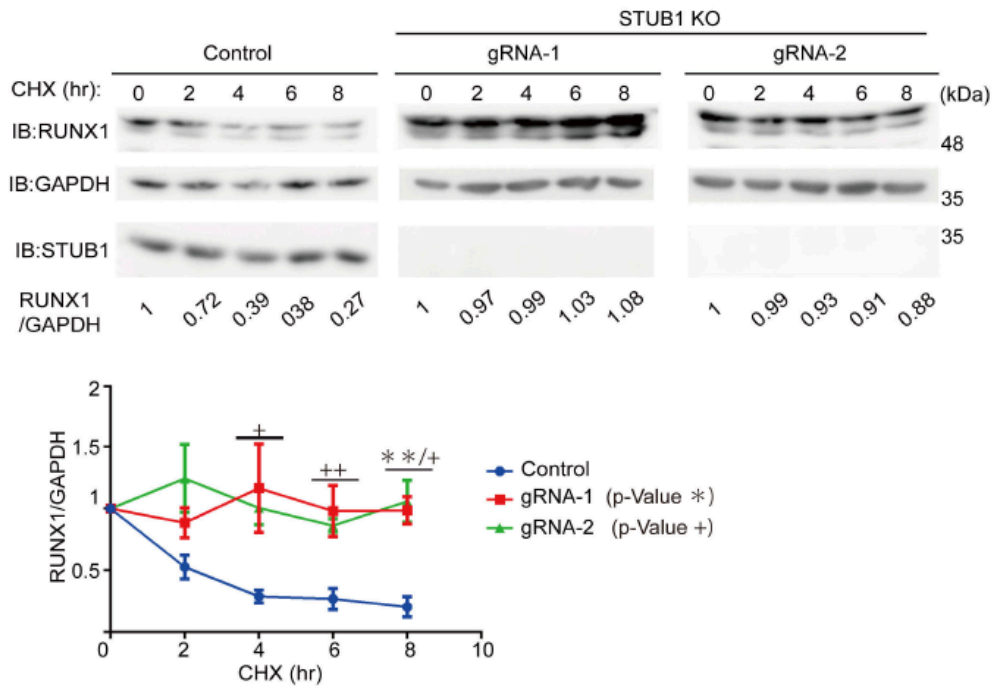


図 2-10

### STUB1 欠失が RUNX1 の安定性に与える影響の検討

図 2-9 と同様の細胞に対して、シクロヘキシミドを 25 ug/ml 加え図に示した時間ごとに RUNX1 のタンパク質量を測定した。また、RUNX1 及び GAPDH の発光強度は、Multi Gauge (Science Lab) を用いて定量した。この実験は独立した 2 回 (n=2) の試行で行った (+/- SEM、\*\*P<0.01、+P<0.05、++P<0.01 を示す)。

### b2. STUB1 は RUNX1 の局在変化及び転写活性を阻害する

基質タンパク質は、ユビキチン化修飾を受けることによって細胞内の局在を変化させることが知られている。また、RUNX1 は主に核内に存在し、STUB1 は主に細胞質に存在することが知られている。そこで、STUB1 が RUNX1 の細胞内局在へ及ぼす影響を、間接蛍光抗体法を用いて調べた。293T 細胞に RUNX1 及び FLAG-STUB1 を一過性に発現し、細胞内オルガネラを固定した後、anti-RUNX1 抗体及び anti-FLAG 抗体を用いて RUNX1 及び STUB1 のタンパク質局在をそれぞれ検出した (図 2-11 A)。興味深いことに、STUB1 は RUNX1 の細胞質への移行を促進することが判明した。また、プロテアソーム阻害剤である MG132 の添加による細胞質の RUNX1 の増加は認めないため、タンパク分解非依存的に RUNX1 の細胞内局在の変化をもたらしたか、プロテアソーム非依存的分解経路により、RUNX1 の分解が制御されている可能性が考えられる (図 2-11 B)。

## 図 2-11

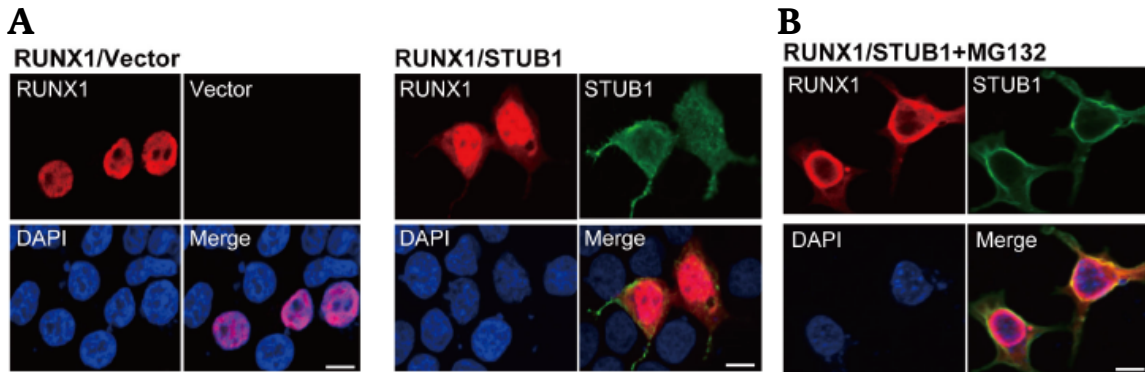


図 2-11

一過性過剰発現下における STUB1 が RUNX1 の細胞内局在に与える影響の検討

- A. 293T 細胞に RUNX1 及びベクターコントロール又は FLAG-STUB1 を一過性に発現させ、anti-RUNX1 (ウサギ) 及び anti-FLAG (マウス) 抗体と共に、anti-ウサギ Alexa568 (赤) 及び anti-マウス Alexa488 (緑) 抗体によって染色した。核は、DAPI (青) によって染色した。スケールバー 10  $\mu\text{m}$  であり、Confocal laser scanning microscopy (Nikon A1) により RUNX1 及び STUB1 の局在を観察した。
- B. 20  $\mu\text{M}$  の MG132 を加え A と同様の実験を行った。

さらに、血球系細胞株、K562 細胞、においても一過性の STUB1 発現が内因性 RUNX1 の細胞質への移行を促進することを突き止めた (図 2-12)。これらの結果は、STUB1 による RUNX1 のユビキチン化修飾が RUNX1 の細胞内局在を制御していることを示している。

## 図 2-12

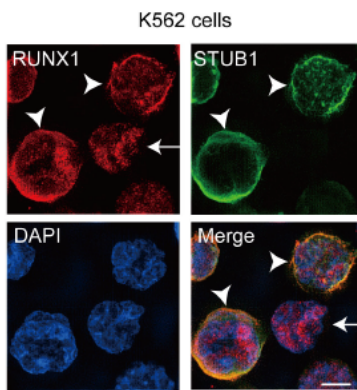


図 2-12

STUB1 が内因性 RUNX1 の細胞内局在に与える影響の検討

K562 細胞に FLAG-STUB1 を遺伝子導入し、anti-RUNX1 (ウサギ) 及び anti-FLAG (マウス) 抗体と共に、anti-ウサギ Alexa 568 (赤) 及び anti-マウス Alexa 633 (緑) 抗体によって染色した。核は、DAPI (青) によって染色した。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$  で、The super resolution microscopy (Nikon SIM) を用いて、内因性 RUNX1 及び過剰発現 STUB1 の細胞内局在を観察した。RUNX1 単独発現においては、RUNX1 の局在は核内に留まるのに対し (矢印)、STUB1 導入細胞においては、RUNX1 の局在は核及び細胞質に共局在した (矢頭)。

次に、レポータープラスミド pMCSFR-Luc を用いて RUNX1 の転写活性化能に STUB1 が関与するのかを検証した。MCSFR レポータープラスミドは、プロモーター領域に RUNX1 認識配列を含んでいる。293T 細胞に pMCSFR-luc と共に RUNX1、CBFB、STUB1 又はコ

ントロールベクターを一過性に発現させた。このアッセイでは、RUNX1 単独で軽度に、RUNX1 及び CFBF の共発現で強い転写活性能を示した。また、これら RUNX1 及び RUNX1/CBFB による MCSFR に対する転写活性は、STUB1 の一過性の発現により減少することを突き止めた (図 2-13)。以上の結果より、STUB1 は RUNX1 の細胞内局在を変化させ、RUNX1 の転写活性能を阻害することが分かった。

図 2-13

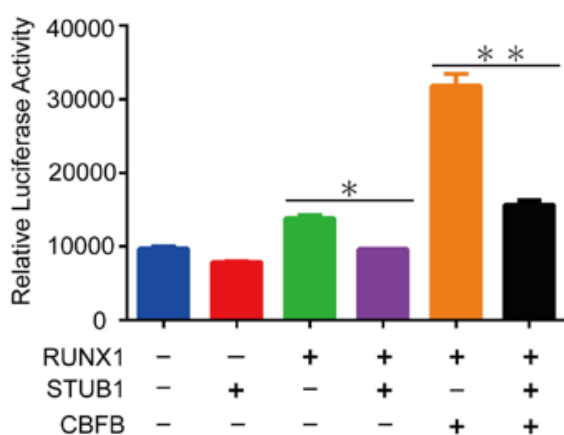


図 2-13  
STUB1 が RUNX1 の転写活性に与える影響の検討

293T 細胞に pMCSFR-luc と共に、RUNX1、CBFB、STUB1 又はコントロールベクターを一過性に発現させ、pMCSFR-luc の転写活性能を評価した。解析評価の正規化には、pMYs-IGベクターを他のプラスミドと同時に遺伝子導入し、GFP 陽性細胞の割合より転写効率を算出した。全てのルシフェラーゼアッセイは、独立した 3 回の試行 (n=3) で行った (+/- SEM、\*P=0.0054、\*\*P=0.0055 を示す)。

### b3. STUB1 は RUNX1-RUNX1T1 のユビキチン化及び分解を誘導する

次に、STUB1 が白血病関連融合タンパク質 RUNX1-RUNX1T1 のユビキチン化及び分解にも関与するのか検討した。HA-RUNX1-RUNX1T1、FLAG-STUB1 及び Myc-ユビキチンを 293T 細胞に一過性に発現させた。また、タンパク抽出液を anti-HA 抗体を用いた RUNX1-RUNX1T1 を基質とした共免疫沈降により、ユビキチン化 RUNX1-RUNX1T1 を anti-Myc 抗体を用いて検出した。その結果、STUB1 は主に核内で RUNX1-RUNX1T1 のユビキチン化及びタンパク質レベル発現低下を誘導する事を突き止めた (図 2-14 A)。また、293T 細胞を用いて共免疫沈降法により STUB1 と RUNX1-RUNX1T1 の結合を確認した (図 2-14 B)。

## 図 2-14

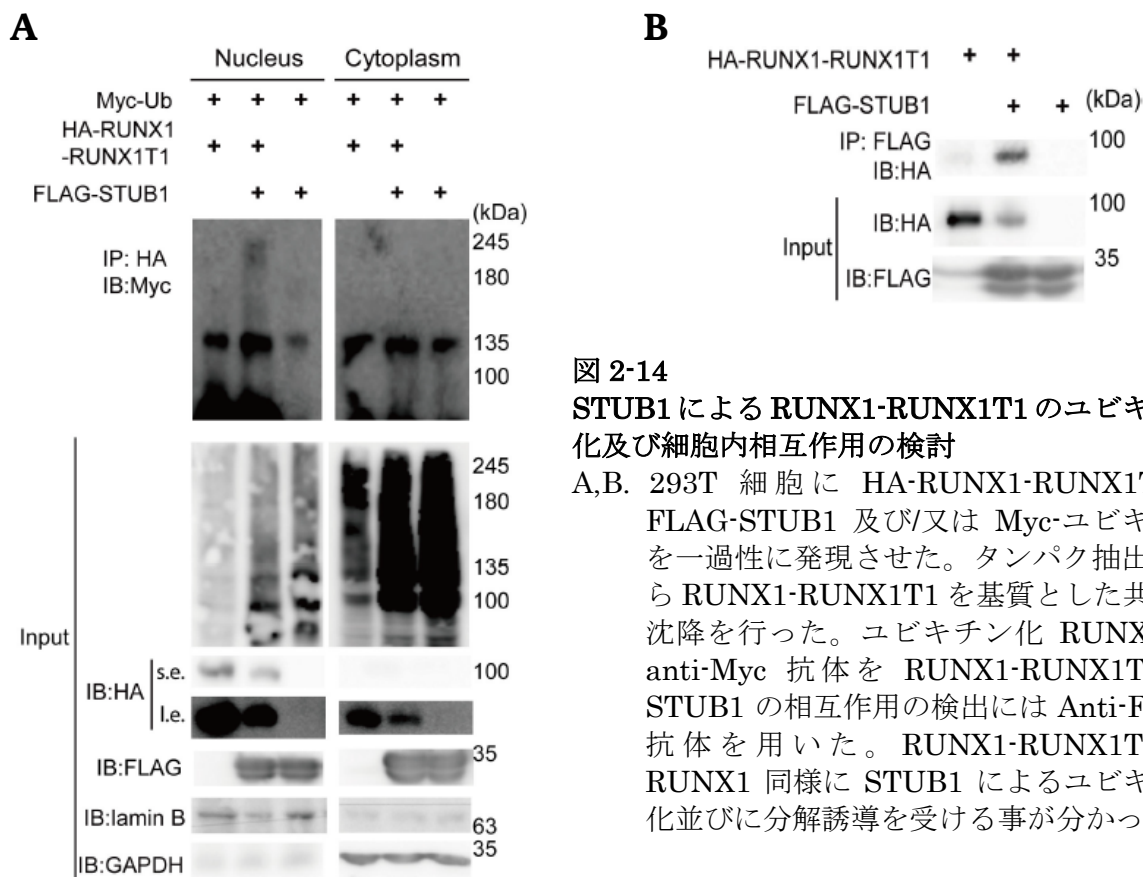


図 2-14

**STUB1** による **RUNX1-RUNX1T1** のユビキチン化及び細胞内相互作用の検討

A, B. 293T 細胞に HA-RUNX1-RUNX1T1、FLAG-STUB1 及び/又は Myc-ユビキチンを一過性に発現させた。タンパク抽出液から RUNX1-RUNX1T1 を基質とした共免疫沈降を行った。ユビキチン化 RUNX1 は anti-Myc 抗体を RUNX1-RUNX1T1 と STUB1 の相互作用の検出には Anti-FLAG 抗体を用いた。RUNX1-RUNX1T1 も RUNX1 同様に STUB1 によるユビキチン化並びに分解誘導を受ける事が分かった。

さらに、RUNX1-RUNX1T1 融合タンパク質を発現する急性骨髄性白血病細胞株 Kasumi-1 に、GFP を共発現する STUB1 を導入した。293T 細胞を用いたときと同様に、STUB1 の過剰発現は RUNX1 及び RUNX1-RUNX1T1 の発現を抑制した (図 2-15)。

## 図 2-15

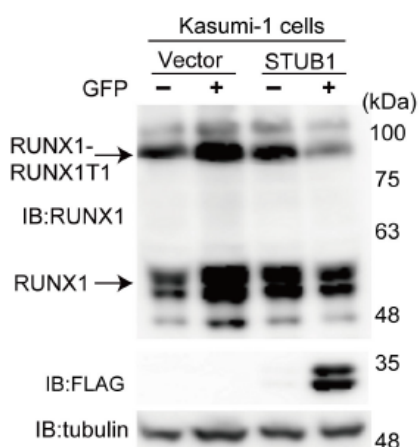


図 2-15

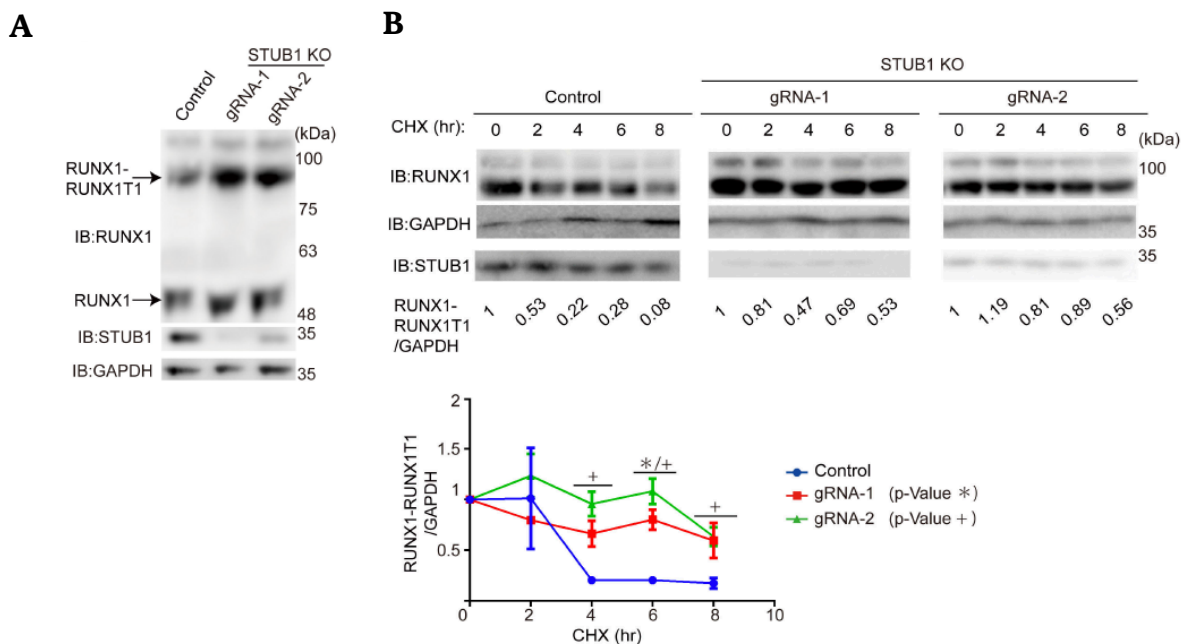
**STUB1** 遺伝子導入による **RUNX1** 及び **RUNX1-RUNX1T1** のタンパク発現の影響の検討

Kasumi-1 細胞に、GFP を共発現するコントロールベクター又は FLAG-STUB1 を導入し GFP 陰性及び陽性細胞を、フローサイトメーターを用いてそれぞれ分離した。分離した細胞のタンパク質を抽出し、anti-RUNX1、anti-FLAG 及び anti-Tubulin 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。FLAG-STUB1 発現細胞において、RUNX1 及び RUNX1-RUNX1T1 の発現低下を認めた。



一方で、Kasumi-1 細胞を用いて CRISPR/Cas9 システムにより STUB1 を欠失したところ、RUNX1-RUNX1T1 のタンパク質発現の上昇及び安定化を認めた (図 2-16 A,B)。これらのデータは、STUB1 が RUNX1 と同様に RUNX1-RUNX1T1 のユビキチン化及び分解制御に関与していることを示唆している。

**図 2-16**



**図 2-16**

内因性 STUB1 が RUNX1-RUNX1T1 のタンパク質発現及び安定性に与える影響の検討

- A. Kasumi-1 細胞にベクターコントロール及び二つの独立した STUB1 をターゲットとした gRNA を導入した。gRNA の導入により STUB1 の発現は減少し、その結果、RUNX1 及び RUNX1-RUNX1T1 の発現上昇を認めた。
- B. A で用いた STUB1 欠失 Kasumi-1 細胞に、シクロヘキシミドを 25 µg/ml 加え、図に示した時間ごとに細胞回収し、それぞれの RUNX1 タンパク質の発現量を解析した。RUNX1-RUNX1T1 及び GAPDH の発光強度は、Multi Gauge (Science Lab) を用いて定量した。この実験は独立した 2 回 (n=2) の試行で行った (+/- SEM、\*\*P<0.01、+P<0.05、\*\*P<0.01 を示す)。

しかしながら、RUNX1-RUNX1T1 の細胞内局在は STUB1 の一過性発現では変化せず、核外移行に関しては、RUNX1 の C 末端側が重要である可能性が示唆された (図 2-17)。

図 2-17

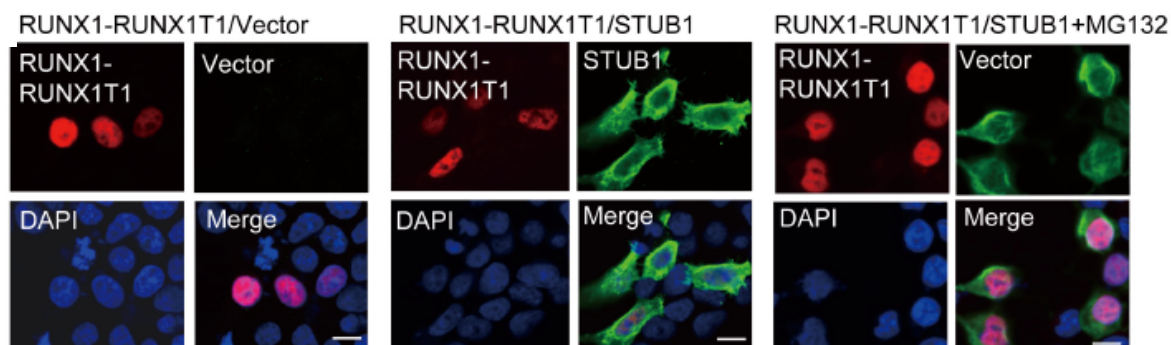


図 2-17

#### STUB1 が RUNX1-RUNX1T1 の局在与える影響の検討

293T 細胞に RUNX1-RUNX1T1 及びベクターコントロール、FLAG-STUB1、又は 20  $\mu$ M の MG132 存在下において RUNX1-RUNX1T1 及び FLAG-STUB1 を一過性に発現させ、anti-RUNX1 (ウサギ) 及び anti-FLAG (マウス) 抗体と共に、anti-ウサギ Alexa568 (赤) 及び anti-マウス Alexa488 (緑) 抗体によって染色した。核は、DAPI (青) によって染色した。スケールバーは 10  $\mu$ m で、Confocal laser scanning microscopy (Nikon A1) により RUNX1-RUNX1T1 及び STUB1 の局在を観察した。

#### b4. STUB1 は RUNX1-RUNX1T1 白血病細胞株の増殖を抑制する

最後に、STUB1 の活性化が造血腫瘍細胞株に与える影響を検討した。Kasumi-1 及び SKNO-1 造血器腫瘍細胞株は、*RUNX1-RUNX1T1* 融合遺伝子を保有している。一方で K562、THP-1、HEL 及び HL-60 造血器腫瘍細胞株は、*RUNX-RUNX1T1* 融合遺伝子を保有していない細胞株である。RUNX1 及び STUB1 は、それら細胞株の全てに発現しているが STUB1 の発現量が最も低い HEL 細胞では RUNX1 の発現が高く、STUB1 の発現量が最も高い THP1 細胞では RUNX1 の発現量が低い傾向にあった。また、RUNX1-RUNX1T1 白血病細胞株 (Kasumi-1, SKNO-1) では、比較的 STUB1 の発現量が低い傾向にあった (図 2-18)。

この結果は、STUB1 のタンパク質レベルでの発現量が RUNX1 のタンパク質量を制御している可能性を示唆している。

図 2-18

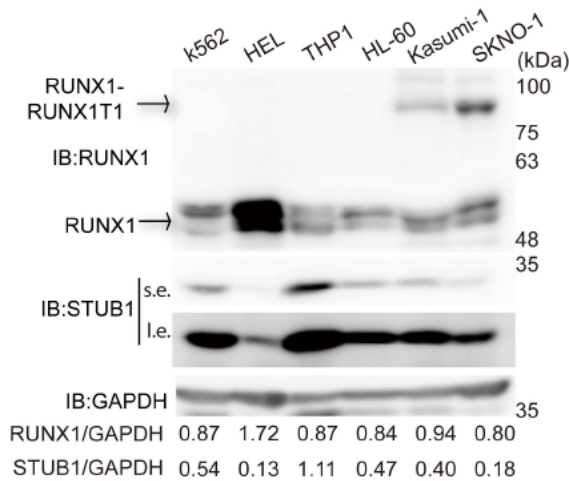


図 2-18

**RUNX1 及び STUB1 の造血器腫瘍細胞株内におけるタンパク質発現量の検討**

STUB1 及び RUNX1 は、骨髄性白血病細胞株において発現しており、RUNX1-RUNX1T1 白血病細胞株 (Kasumi-1 及び SKNO-1) において、STUB1 の発現レベルは他の細胞株と比べて比較的低い。細胞株 HEL は RUNX1 の発現が最も高く、STUB1 の発現は最も低い。

また、Kasumi-1 及び SKNO-1 白血病細胞株にレトロウイルスベクターを用いて GFP を共発現する STUB1 及び STUB1K30A を遺伝子導入した。その結果、野生型 STUB1 は Kasumi-1 及び SKNO-1 細胞の増殖を顕著に抑制したが、STUB1 機能欠失型 K30A 変異体では顕著な増殖抑制は示さなかった (図 2-19)。

図 2-19

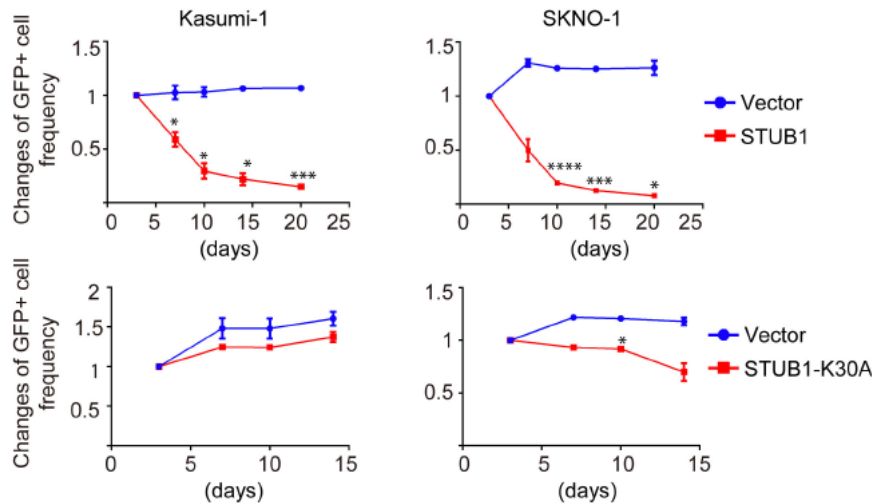


図 2-19

**STUB1 活性化による RUNX1-RUNX1T1 細胞株の増殖に与える影響の検討**

GFP を共発現するベクターコントロール、野生型 STUB1 及び STUB1-K30A 変異体を RUNX1-RUNX1T1 白血病細胞株 (Kasumi-1 及び SKNO-1) に導入した。GFP 陰性及び陽性細胞を共培養し、GFP 陽性率をフローサイトメーターで測定した。遺伝子導入後三日目の GFP 陽性率を 1 とし、経時的に GFP 陽性率を測定した。この実験は独立した 2 回 (n=2) の試行で行った (+/- SEM\*P<0.05、\*\*\*P<0.005、\*\*\*\*P<0.001 を示す)。STUB1 の過剰発現は、RUNX1-RUNX1T1 白血病細胞株の増殖を強く抑制した。この抑制能は、STUB1-K30A 変異体では顕著には見られなかった。

また、Kasumi-1 及び SKNO-1 細胞に STUB1 を高発現させることにより AnnexinV 陽性細胞の割合が増加し、S/G<sub>2</sub>/M 期の細胞が減少した (図 2-20 A,B)。したがって、STUB1 は、細胞周期の進行を阻止し、アポトーシスを誘導することにより RUNX1-RUNX1T1 細胞の増殖を抑制していると考えられる。

図 2-20

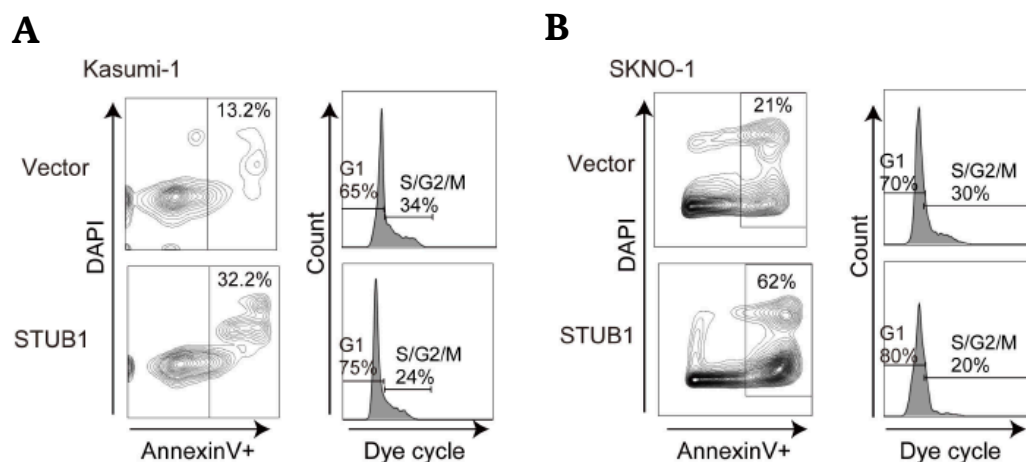


図 2-20

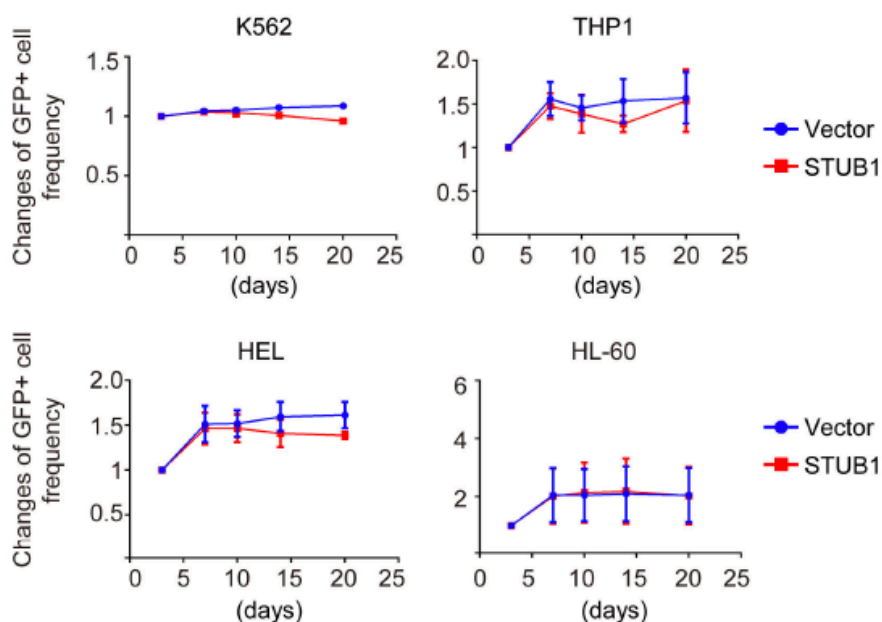
#### STUB1 の活性化がもたらす、RUNX1-RUNX1T1 細胞株増殖抑制の原因究明

ベクターコントロール又は野生型 STUB1 (共に GFP を共発現する) を RUNX1-RUNX1T1 白血病細胞株 (Kasumi-1 及び SKNO-1) に導入し、GFP 陽性細胞をソートした。またそれら細胞を用いて、細胞周期 (サブ G1 期領域は除いている) 及びアポトーシス誘導能を評価した。STUB1 過剰発現は、S/G<sub>2</sub>/M 期の低下及び Annexin V 陽性細胞の増加によりアポトーシスが亢進していることが分かった。

一方 STUB1 の活性化は、RUNX1-RUNX1T1 保有細胞株以外の骨髓性白血病細胞株では、増殖抑制能を示さなかった (図 2-21 A)。さらに、正常のヒト臍帯血細胞に対する STUB1 高発現による影響を調べた。その結果、正常の臍帯血細胞においては STUB1 による増殖抑制は認められなかった (図 2-21 B)。これらのデータは、STUB1 の活性化が RUNX1-RUNX1T1 白血病細胞特異的な増殖阻害能を有していることを示している。

図 2-21

A



B

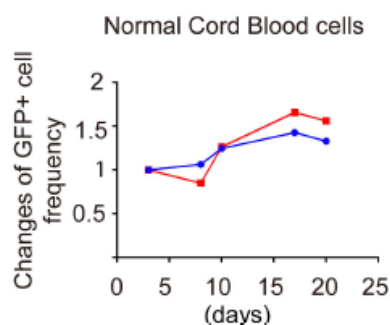


図 2-21

STUB1 活性化による RUNX1-RUNX1T1 非保有急性骨髄性白血病細胞株及びヒト臍帯血細胞を用いた正常造血細胞に与える影響の検討

A, B. *RUNX1-RUNX1T1* 融合遺伝子を保有していない細胞株 (K562、THP1、HEL 及び HL-60 細胞) やヒト臍帯血細胞に関して図 2-19 と同様の実験を行った。RUNX1-RUNX1T1 を保有していない細胞及び正常造血細胞において、増殖抑制能は見られなかった。

以上の結果より、STUB1 は RUNX1 及び RUNX1-RUNX1T1 の分解を誘導する E3 リガーゼであることを突き止めた。さらに、STUB1 の活性化は RUNX1-RUNX1T1 造血器腫瘍に対して有効な治療戦略になる可能性も示唆された。

### c. E3 リガーゼ DTX2 による RUNX1 の制御

当該部分は、雑誌掲載する予定があり公表を控える。

## d. E3 リガーゼ RNF38 による RUNX1 の制御

### d1. RNF38 は RUNX1 のユビキチン化及び安定化を促進する

“AlphaScreen” により同定した RUNX1 結合 E3 リガーゼのうち RNF38 は、2 つの核局在化シグナルと E2 エンザイムが結合する RING フィンガードメインを保有する E3 リガーゼである (図 2-36)。

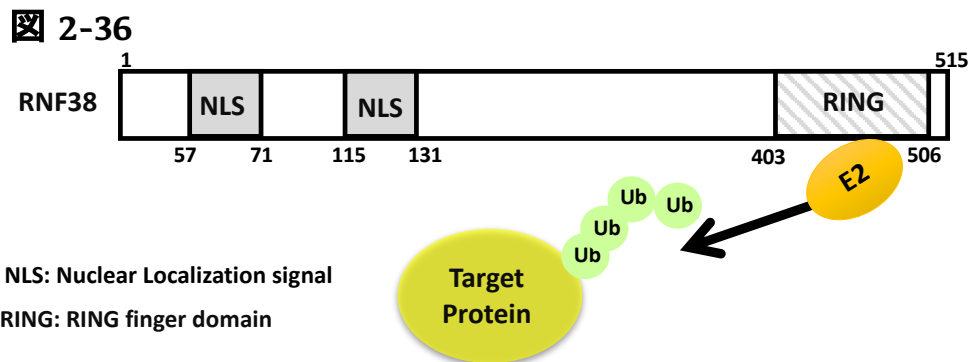


図 2-36

#### E3 リガーゼ RNF38 の模式図

E3 リガーゼ DTX2 同様、RNF38 も RING フィンガードメインを包有し、RING フィンガードメインは E2 エンザイムと結合する。また、近年の報告で RNF38 は多くの固形腫瘍において癌細胞の増殖を亢進するとされている。

また、核内において RNF38 は p53 と結合し凝集体を形成し、核内での p53 の機能を制御する可能性が示唆された (Sheren *et al* 2013)。さらに、肝細胞癌や結腸・直腸癌など複数の固形腫瘍において、癌関連因子 AHNAK を分解することにより癌細胞の増殖を助長していることが報告された (Peng *et al* 2019)。以上の点を踏まえて、RNF38 における RUNX1 に対する影響を調べた。まず、STUB1 及び DTX2 と同様に、RNF38 においても RUNX1 に対するユビキチン化への影響を探索した。293T 細胞に Myc-RUNX1、FLAG-ユビキチン及び RNF38 を一過性に発現させた。さらにタンパク抽出液に対して、anti-Myc 抗体による RUNX1 を基質とした共免疫沈降を行い、anti-FLAG 抗体を用いてユビキチン化 RUNX1 を検出した。その結果、RNF38 発現時に顕著な RUNX1 のユビキチン化バンド及び RUNX1 タンパク質の増加を認めた (図 2-37 A)。さらに、RNF38 が核内で p53 と作用することから核と細胞質に分けてタンパク質を回収し、RNF38 に対する RUNX1 のユビキチン化能を検討したところ、核と細胞質分画ににおいて異なるユビキチン化 RUNX1 のバンドシフトを検出した (図 2-37 B)。

## 図 2-37

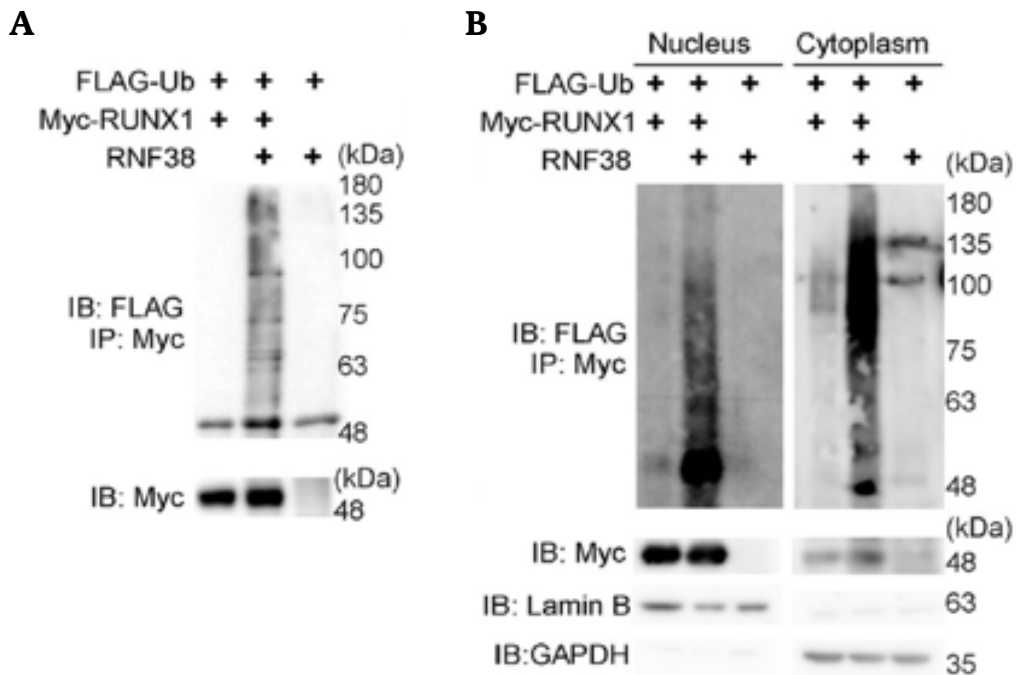


図 2-37

### RNF38 による RUNX1 のユビキチン化能の検討

A. 293T 細胞に Myc-RUNX1、FLAG-ユビキチン及び RNF38 を一過性に発現させタンパク抽出液を、anti-Myc 抗体を用いて RUNX1 を基質とした共免疫沈降を行った。また、ユビキチン化 RUNX1 を検出するために、anti-FLAG 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

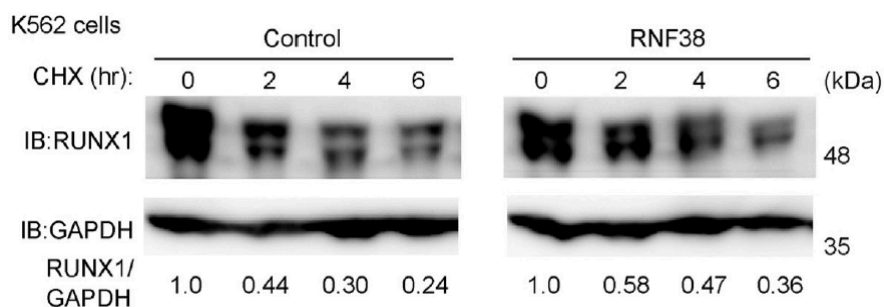
B. A で行った実験を核と細胞質分画に分けて行った。

シクロヘキシミド (CHX) を用いて RNF38 が RUNX1 のタンパク質の安定性に影響を与えるかを検討した。K562 細胞に、レトロウィルスベクターを用いて RNF38 を遺伝子導入し RNF38 の安定発現細胞株を樹立した。次に、CHX を添加し、0、2、4、6 時間ごとに細胞を回収し、回収したサンプルの RUNX1 のタンパク質発現量をウェスタンブロッティングにより検出した。その結果、RNF38 は RUNX1 の安定性を高めることがわかった (図 2-38)。また、ユビキチン化によるタンパク質分解機構は、大きく分けてプロテアソーム経路とオートファジー経路に分けられる。そこで、RNF38 がどちらの経路による分解を抑制しているのかを検討した。まず、K562 細胞にプロテアソーム阻害剤 MG132 又はオートファジー阻害剤 NH<sub>4</sub>Cl を加えタンパク質を回収しウェスタンブロッティングを行った。その結果、RUNX1 は MG132 及び NH<sub>4</sub>Cl どちらを加えた際もタンパク質レベルでの増加を認めた (図 2-39 A)。したがって、RUNX1 はプロテアソーム及びオートファジー両経路においてタンパク質分解制御を受ける可能性が示唆された。



次に、RNF38 安定発現細胞株にオートファジー誘導剤としても知られるラパマイシンを添加した際の RUNX1 タンパク質の安定性を評価した。コントロール群では、ラパマイシン添加時に RUNX1 の顕著な減少を認めたが、RNF38 安定発現細胞株ではその効果は減弱した (図 2-39 B)。したがって、RNF38 はオートファジー経路を介した RUNX1 のタンパク質分解を阻害し、RUNX1 の安定化に寄与していることが示された。

**図 2-38**

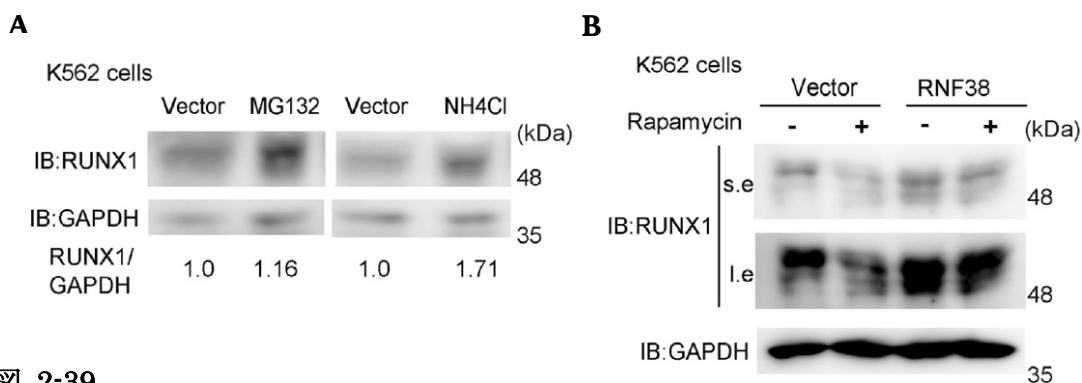


**図 2-38**

#### RNF38 による RUNX1 のタンパク質安定性の検討

K562 細胞に pMys-IG-RNF38 を遺伝子導入後、GFP 陽性細胞をセルソーターで回収した。回収した細胞にシクロヘキシミドを 25  $\mu\text{g/ml}$  加え、図に示した時間ごとの RUNX1 のタンパク質量を測定した。また RUNX1 及び GAPDH の発光強度は、Multi Gauge (Science Lab) を用いて定量した。

**図 2-39**



**図 2-39**

#### RNF38 の RUNX1 分解抑制機構の検討

- A. K562 細胞に 10  $\mu\text{M}$  の MG132 又は 25 mM の NH<sub>4</sub>Cl を加え 4 時間培養後、細胞を回収した。回収した細胞よりタンパク質を抽出して、ウェスタンブロッティングにより RUNX1 タンパク質を検出した。また、RUNX1 及び GAPDH の発光強度は Multi Gauge (Science Lab) を用いて定量した。
- B. 図 2-38 で利用した細胞に、オートファジー誘導剤としても知られる 100 nM のラパマイシンを加え 4 時間後細胞を回収した。回収した細胞よりタンパク質を抽出して、ウェスタンブロッティングにより RUNX1 タンパク質を検出した。

## d2. RNF38 は RUNX1 の転写抑制能及び分化誘導能を助長する

最後に、RNF38 の RUNX1 の安定化が RUNX1 の転写活性及び分化誘導能に影響を与えるのか検討した。まず、pMCSFR を用いてレポーターアッセイを行ったところ、RUNX1 及び CBFB で顕著な転写活性の上昇は認められたが、RNF38 の存在の有無で顕著な差は見られなかった (図 2-40 A)。さらに、赤芽球系細胞の維持に重要な転写因子 KLF1 によるレポーターアッセイを行った。RUNX1 は、KLF1 の遺伝子発現を抑制して赤芽球系から巨核球の分化を誘導することが知られている (Kuvardina *et al* 2015)。そこで、293T 細胞に pKLF1-luc と共に RUNX1、CBFB、RNF38 又はコントロールベクターを一過性に発現させた。その結果、KLF1 の転写活性は RUNX1 又は RUNX1-CBFB の共発現時に顕著に低下し、さらに RNF38 は RUNX1 による KLF1 への転写抑制能を助長することが分かった (図 2-40 B)。

図 2-40

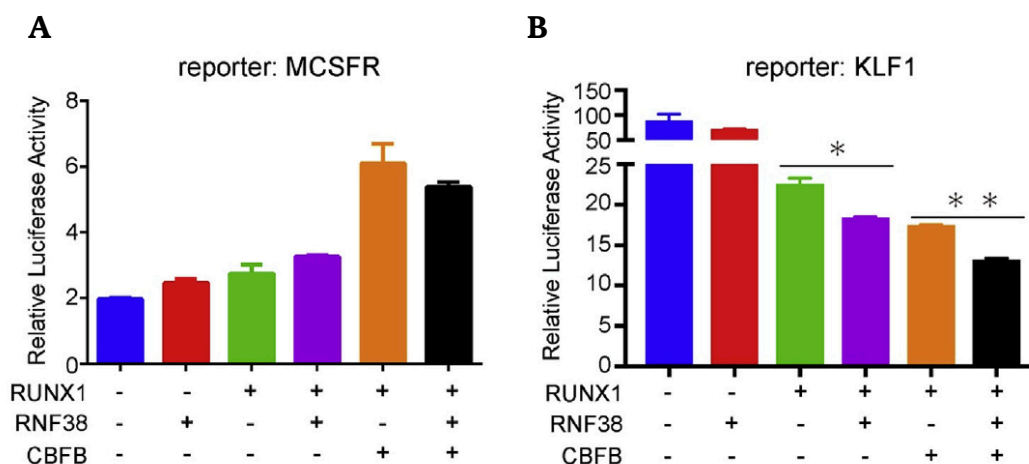


図 2-40

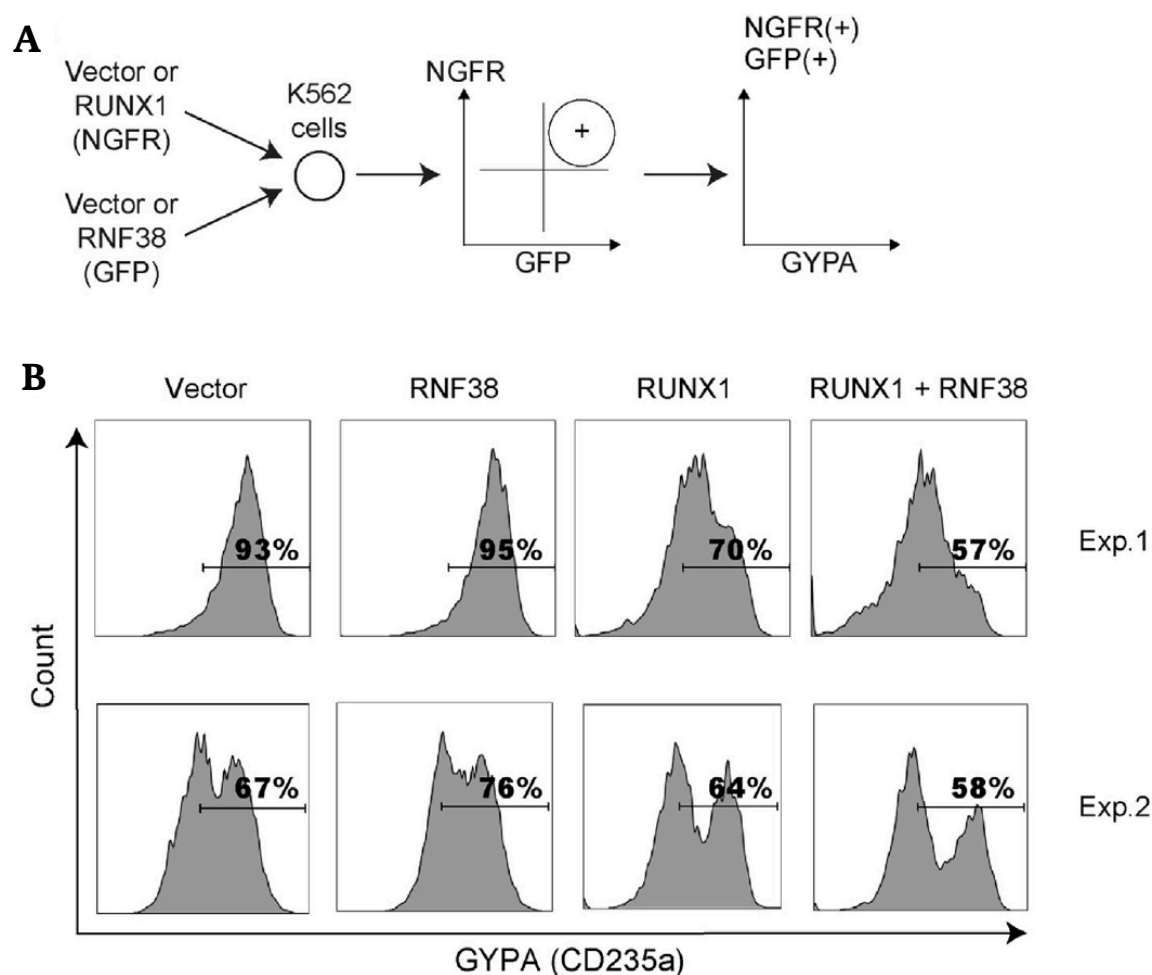
### RNF38 が RUNX1 の転写活性能に与える影響の検討

A.B. 293T 細胞に pMCSFR-luc 又は pKLF1-luc と共に RUNX1、CBFB、RNF38 又はコントロールベクターを一過性に発現させ、pMCSFR-luc 又は pKLF1-luc の転写活性能を評価した。全てのルシフェラーゼアッセイは、独立した 3 回の試行 (n=3) で行った (+/- SEM、B \*P=0.0256, \*\*P=0.0019 を示す)。

次に、KLF1 が制御している赤芽球系細胞の表面抗原 GYPA (CD235a) を発現している K562 細胞を用いて、RUNX1 による赤芽球系分化抑制能と RNF38 の関与を検討した。K562 細胞に、レトロウィルスベクターを用いて NGFR-RUNX1 及び GFP-RNF38 を遺伝子導入

し GYPA の発現変化を観察した。その結果、RUNX1 導入細胞株では GYPA の表面抗原マーカーが顕著に減弱し、RNF38 はその効果を増強した (図 2-41 A,B)。

**図 2-41**



**図 2-41**

**RNF38 が RUNX1 の分化誘導能に与える影響の検討**

- A. 実験の模式図。K562 細胞にレトロウイルスベクターを用いて、pMYs-INGFR-RUNX1 及び pMYs-IG-RNF38 又はそれらに付随するベクターを遺伝子導入した。
- B. pMYs-INGFR-RUNX1 及び/又は pMYs-IG-DTX2 が発現している K562 細胞の各分画の GYPA 陽性率をフローサイトメーターを用いて観察した。

以上の結果より、RNF38 は RUNX1 のユビキチン化及び安定化を誘導し、さらに、RUNX1 と協調して RUNX1 の転写抑制能及び分化誘導能を増強することを見出した。

## 考察

先行研究より、RUNX1 のユビキチン化を誘導する幾つかの E3 リガーゼが同定されてきたが、それら E3 リガーゼが、RUNX1 の生理学的機能にどのように関与しているのか詳細な分子機構は不明であった。本研究では、“AlphaScreen” を用いたハイスループットスクリーニング、細胞レベルでの生化学的解析や造血器腫瘍細胞株を利用した生理学的解析を用いて、RUNX1 の責任 E3 リガーゼが STUB1、DTX2 及び RNF38 であること、これらのユビキチン化修飾が RUNX1 に対して異なる作用を示すことを突き止めた (Yonezawa *et al* 2017 and 2018)。

STUB1 は RUNX1 及び RUNX1-RUNX1T1 のユビキチン化及び分解を誘導することを突き止めた。この結果は、Stub1 が Runx1 のユビキチン化及び分解を誘導するという、マウスの遺伝子を用いた先行研究と一致する (Li *et al* 2008 and Shang *et al* 2009)。また、シャペロンタンパク質 HSP との結合を低下させた STUB1-K30A 変異体の遺伝子導入では、RUNX1-RUNX1T1 保有造血器腫瘍細胞株の顕著な増殖抑制は起きなかった。一方、RUNX1-RUNX1T1 は同じくシャペロンタンパク質の一つである HSP90 と結合し安定化することが知られており、今回の結果と合わせると、STUB1-HSP90 複合体は RUNX1 及び RUNX1-RUNX1T1 タンパク質の安定性の調整に重要な役割を担っている可能性がある (Bost *et al* 2014 Yan *et al* 2007)。

DTX2 は、RUNX1 の分解は誘導しなかったが、RUNX1 の活性に重要なアセチル化と拮抗することで、RUNX1 の機能低下を引き起こした。DTX2 と RUNX1 は染色体逆位転座による融合遺伝子の症例が報告されており、DTX2 の不活性化が RUNX1 依存性白血病の一因となる可能性も示唆されている (Maki *et al* 2012)。また、RUNX1-RUNX1T1 はヒストンの脱メチル化に関わる Jumonji domain containing 1C (JMJD1C) と協調することにより、白血病細胞の維持に関与する事が報告されている (Chen *et al* 2015)。一方、DTX2 はこの JMJD1C のモノユビキチン化に関わり、JMJD1C を負に制御することが示唆されているため (Luo *et al* 2017)、DTX2 は RUNX1-RUNX1T1 を直接的に制御しないことが本研究により示されたが、DTX2 における RUNX1-RUNX1T1 及び JMJD1C の関連研究も非常に興味深い。

また、STUB1 及び DTX2 は RUNX1 の核外移行を誘導したが、RUNX1-RUNX1T1 の核外移行は引き起こさなかった。これらの結果は、RUNX1 の核局在化シグナルが Runt ドメインの末端に存在することが知られており、その差異が今回の結果に結び付いている可能性を示唆している。また、STUB1、DTX2 及び RUNX1 は T 細胞の発達及び調整に重要な役割を担っている可能性が報告されている (Chen *et al* 2013, Lehar *et al* 2006 and Zhang *et al* 2020)。

したがって、STUB1 又は DTX2 と RUNX1 の相互作用やタンパク質発現のバランスを免疫応答の観点から研究することもとても興味深い。さらに、STUB1 及び DTX2 の活性上昇は RUNX1 依存性白血病細胞株の増殖を抑制することから、STUB1 及び DTX2 はこれらの造血器腫瘍における良い治療標的であると言える。

一方、RNF38 は RUNX1 のユビキチン化及び安定化を誘導することを見出した。さらに、RNF38 の安定化は RUNX1 の機能を亢進し、赤芽球細胞の維持に重要な転写制御因子 KLF1 の機能を抑制することを見出した。また、RUNX1 は骨髄球系への分化に重要な MCSFR の転写亢進を行うことが知られているが、RNF38 による RUNX1 の安定化は、MCSFR の活性には影響を与えなかった。以上の結果から、RNF38 は RUNX1 による転写抑制に重要な役割を果たしていると考えられ、更なる解析が必要である。また、興味深いことに RNF38 の安定化は、リソソーム・オートファジー経路による RUNX1 の分解を抑制することでもたらされていることが示唆された。さらに、STUB1 によるタンパク分解は、リソソーム・オートファジー経路を介するとの報告もあるため (Rao *et al* 2017 and Sha *et al* 2017)、STUB1 及び RNF38 による競合的 RUNX1 の制御機構についても今後解析を行いたい。STUB1 や DTX2 による核外移行は、RUNX1 を細胞質に存在するリソソームに伝達する役割があるのでは無いかと考えられる。

さらに、今回同定した 3 つの E3 リガーゼは、RUNX1 の分解、アセチル化の低下及び安定化というように 3 つの異なる役割を示した。しかし、この差異がどのように生じるのかは分かっていない。それを紐解く鍵としては、RUNX1 のユビキチン化修飾鎖の違いが考えられる。近年、質量分析器を用いたユビキチン修飾鎖の解析によると、ポリユビキチン鎖を形成するユビキチン同士の結合も多岐にわたり、例えば、K48 型や K63 型ユビキチン鎖などの鎖の種類により異なるシグナル経路を制御することが報告されている (Tsuchiya *et al* 2013, Ohtake *et al* 2015 and 2016)。また、RUNX1 自身複数のユビキチン化修飾部位を保有するため、RUNX1 のユビキチン化修飾部位もこれらの差を生み出しているの一因と考えられる。さらに、RUNX1 のリン酸化も RUNX1 の安定性に関与することから、ユビキチン化以外の他の翻訳後修飾とユビキチン化の関連を調べることも今後重要な課題である。

以上のように、3 つの E3 リガーゼによる RUNX1 のユビキチン化修飾は、修飾されるユビキチン鎖の種類及び長さや修飾部位が異なる可能性が予想される。したがって今後は、これらの違いの原因を明らかにする為に生化学的手法を用いながら、詳細に修飾鎖や修飾部位などを決定していくことも重要な課題になると考えられる。

## 第三章

# RUNX1 のユビキチン化修飾機構を利用 した治療応用

本章は、雑誌掲載する予定があり公表を控える。

## 第四章

# RUNX1-CBFB 結合阻害剤の開発



本章は、雑誌掲載及び特許出願する予定があり公表を控える。

## 第五章

### 結言

## 終わりに

本章は、雑誌掲載及び特許出願する予定があり公表を控える。

## 謝辞

### 東京大学 新領域創成科学研究科 合山 進 教授

本研究を遂行するにあたり、指導教員として修士課程より現在に至るまで研究の立案、戦略構築、論文作成、学会発表等、様々な側面から感謝しきれない程の多大なご指導を頂いたこと心より厚く御礼申し上げます。自分で言うのも大変恐縮ではございますが、修士課程入学時の自分と今の自分を比較すると、東京大学大学院にて一番成長した大学院生と言っても過言ではないくらい成長したと自負しております。これは、紛れもなく先生のご指導があったからだと思います。先生の教えを大切にし、これからも努力して参ります。5年間本当にありがとうございました。

### 東京大学 医科学研究所 北村 俊雄 教授

研究室のボスとして、実験の遂行及び研究生活に関する御助言、御指導賜りましたこと誠に感謝申し上げます。修士課程の頃より、毎週欠かさずデータに関してアドバイスを頂いたこと本当に有り難く思っています。また、先生の生き方、色々なことにチャレンジする姿勢はとてがかっこよく、自分もその気持ちをいつまでも持ち続けられる人であろうと“Toshio”イズムを継承し、日々人生を楽しみながら精進して行こうと思います。

### 東京大学 医科学研究所 福山 朋房 助教授

研究の遂行にあたり、実験のご協力及びご助言誠にありがとうございました。先生の研究に対する姿勢、実験丁寧さは非常に感銘を受けました。今後も先生を見習い、日々研究活動に精進して参ります。また、研究外でもテニスをご一緒させて頂いて交友関係も広がり、大変貴重な機会を頂いたこと心より感謝申し上げます。

### 東京大学 医科学研究所 田中 洋介 助教授

実験や進路に関して、多くの御助言をくださったこと心より感謝申し上げます。先生の実験の正確さ及び慎重さなど、大変勉強になりました。また、四年制大学を卒業後、修士課程を経て学位を取得された先輩として、アドバイスを頂き誠にありがとうございました。さらに、研究で辛い時など食事に誘って頂きありがとうございます、大変励みになりました。

### 東京大学 医科学研究所 榎本 豊 助教授

研究や留学に関して、親身に御助して頂いたこと感謝申し上げます。本研究室出身の一先輩として留学され、助教授としてご活躍されている姿大変励みになります。ご一緒させて頂いた期間は短かったですが、人に接する態度や話し方など大変感銘を受けました。

### 同研究室 土屋 秋穂 さん 四方 紫織 さん

実験に必要な試薬や器具の準備など、実験をする上で必要な環境を整えて頂き誠に有難う御座いました。恵まれた環境で、実験をさせて頂いたことに心より感謝申し上げます。土屋さんの丁寧な実験、綺麗なデータ、一研究者の後輩として少しでも近づけるようにこれらかも精進して参ります。四方さんの探究心の強さ、行動力及び発想力を見習いこれからも研究生活に励みます。また帰郷の際、八ツ橋をお土産として毎回届けて頂き本当にありがとうございました。研究で辛い時は、八ツ橋を食べて乗り切りました。

#### 同研究室 土野 香織 さん 石垣 あすか さん

御二方には、終始事務手続きのご協力をして頂き誠にありがとうございます御座いました。学会の手続き、実験サンプルの郵送等大変助かりました、感謝申しあげます。疲れている時、土野さんの笑顔と挨拶を朝受けると元気が湧きその日乗り越えられました。石垣さんのテキパキと仕事をこなす姿、とてもかっこよかったです。今後ともどうぞよろしくお願い致します。

#### 同研究室 佐藤 成 さん 竹田 (浅田) 玲奈 さん 山本 圭太 さん

御三方には、自分が修士課程に入学した時から同時期に博士課程に入学した先輩として温かく、そして優しく見守って頂き誠にありがとうございます御座いました。また、人生の先輩としても人との接し方、人を思いやる気持ちを沢山学びました。本当に、御三方に出会えてよかったです。頂いた白衣は、家宝として大切に使用させて頂きます。『くそ世話になりました!!!』

#### 同研究室 田村 萌 さん 劉 瀟瀟 さん

二人には、修士課程の時から生意気な自分を暖かく、側で見守ってくれて本当に有難う。学会発表の特訓に付き合ってくれたことや、ラボメンバーが卒業する際に、常にアルバム作りを率先してやってくれていたこと本当に感謝しています。また、本論文の作成に際して多くの誤字脱字を見つけ、そして校正をしてくれたことも重ねて深謝致します。二人のおかげで、悔いのない自分の中で最高の作品が出来たと思います。心より感謝申し上げます。

#### 細胞療法分野 先進分子腫瘍学分野の皆様

先輩方には、論理的思考法など筋道建てて考えるすべを学びました。時には鬱陶しくも思いましたが、親身にディスカッションに付き合ってください感謝申し上げます。先輩方とのディスカッションがあったからこそ、今の自分があります。後輩には、丁寧にそして分かりやすく、教えることの大切さや難しさを学びました。相手を第一に思いやりながら、物事を伝える事を忘れずに日々努力して参ります。これからも、暖かく見守って頂ければ幸いです。

#### 愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 澤崎 達也 教授、高橋 弘隆 講師

本研究の“AlphaScreen”に関する実験において、多大なるご協力誠に有難う御座いました。先生方のおかげで、国際紙に論文を投稿することができ深謝致します。また、国際シンポジウム“Protein Island Matsuyama”でも毎年のように発表する機会を頂きありがとうございます。その経験が血肉となり、海外で研究生生活を送ることになりました、感謝致します。

#### 東京大学 医科学研究所 津本 浩平 教授 黒田 大佑 講師 中木戸 誠 講師 田部 亜季 特任助教 山上 由美子 さん 妹尾 暁暢 さん 住川 太一 さん 及び津本研究室の皆様

本研究の化合物探索に関する実験において、多大なるご協力を頂き誠にありがとうございます御座いました。丁寧に、タンパク質精製やバーチャルスクリーニングに関して、ご教授頂いたこと感謝申し上げます。外部の学生にも関わらず、温かく迎えて頂いたことも心より感謝申し上げます。津本研究室での経験を活かして、これからも研究活動に励みます。

#### 東京大学 医科学研究所 長門石 暁 特任准教授

本論文の作成にあたり、化合物スクリーニング全般において、一から丁寧に指導頂いた事感謝申し上げます。博士課程より、第二の指導教員として所属研究室の大学院生でないにも関わらず、親身に研究の進め方など相談に乗って頂き誠にありがとうございます御座いました。先生から学んだ事を活かして、多角に研究を進められるよう日々精進して参ります。また本論文の副査としても審査にご協力頂いたこと感謝申し上げます。

### 東京大学 創薬機構 小島 宏建 教授 建多 奈津恵 研究員

本研究の化合物提供並びに操作に関して、多大なるご協力を頂き誠にありがとうございます御座いました。創薬機構の膨大かつ精密なデータ及び化合物管理お陰で、本研究を遂行することが出来ました。また、創薬の精密さや厳しさやプロトコール作成の重要性など多くを学ばせて頂きました。心より感謝申し上げます。

### 大阪大学 創薬サイエンス拠点 谷 昭義 准教授 林 邦忠 助教授

本研究の“サーマルシフトアッセイ”を用いた化合物スクリーニングにおいて、効率的に一万化合物及び標的タンパク質を分注して頂き誠に有難う御座いました。また、スクリーニングに関するアドバイス、機械の貸与も大変助かりました。さらに、効率良くスクリーニングを行うノウハウも沢山学ばせて頂き誠にありがとうございます御座いました。

### 東京大学 医科学研究所 石井有 実子 さん 小宮由 紀子 さん 藤田 梓さん 渡海 紀子さん

本研究におけるフローサイトメトリー解析及び顕微鏡観察の実施に際して、多大なるご協力を頂いたこと誠に感謝申し上げます。また、データの解釈及びまとめ方などもご指導頂きありがとうございます御座いました。医科学研究所コアラボラトリーの恵まれた環境で、研究活動に専念できたこと重ねて心より御礼申し上げます。

### 東京大学 医科学研究所 内丸 薫 教授 今井 陽一 准教授 西山 敦哉 准教授

本論文の作成にあたり、副査として論文の査読及びご指導頂いたこと心より感謝申し上げます。本論文の査読や学位論文審査会において、多くの御助言をくださった事も重ねて御礼申し上げます。本論文作成期間及び発表期間は、学ぶ事が普段の数倍以上あり自分にとって素晴らしい経験となりました。この経験を糧に今後も研究生活に励みます。

### 明治薬科大学 長浜 正己 教授 石田 陽一 講師

本研究生活を送るにあたり、研究の面白さや厳しさを教えて頂き誠に感謝申し上げます。自分が研究の右も左もわからない学部生時代に、先生方から生物学研究の基礎を叩き込んで頂いたお陰で今の自分があります。本当にありがとうございますございました。

### 新領域創生科学研究科の皆様

研究科の皆様には、本論文や助成金等の手続きの際いつも丁寧にそして迅速に対応して頂いたこと心より感謝申し上げます。申請書に関して、細かく不備等目を通して頂き誠に有難う御座いました。皆様のおかげで、日本学術振興会海外特別研究員や他の海外留学に向けた助成金も獲得することができました、心より感謝致します。また、恵まれた環境で研究活動に打ち込ませて頂いたことも重ねて御礼申し上げます。

### メディカル情報生命専攻の皆様

メディカル情報生命専攻では、授業の準備や必要な提出書類等の対応をして頂き誠に有難う御座いました。研究科の本部が無い医科学研究所でも、皆様のご協力で不自由なく生活できた事を心より感謝申し上げます。佐藤先生、中野先生、松田先生、安川さん、横田さん及び佐々木さんをはじめとする多くの方々のサポートのもとで、研究生活に打ち込む事が出来ました。大変恵まれた環境を整えて頂いたこと厚く御礼申し上げます。

東京大学 医科学研究所 東條 有伸 病院長 四柳 宏 教授 北海道大学 小児科 真部 淳 教授  
平林 真介 特任助教授 聖路加国際病院 青木 悠 看護師 桃井 (小川) 恵理子 看護師

私が大学院生活を送るにあたり、健康面で多大なるサポートをして頂いたこと誠に感謝致します。私が研究活動を行うきっかけとなったのは、紛れもなく高校一年生の時に骨髄異形成症候群を発症したことに起因しています。今では、普通の人以上に活力に溢れ研究活動に従事できており、私の治療に関して常に最善を尽くして頂いた先生方には心より深謝申し上げます。

#### 私の両親 米澤 達志氏 米澤 登美子 氏

私が大学院生活を送るにあたり、全面的にサポートをして頂いたこと心より深謝申し上げます。父の職場の方が、自分の研究施設よりも最寄り駅が遠いにも関わらず、無理を言って修士課程の段階から1人暮らしをさせて頂き本当にありがとう御座いました。根拠のない自信ばかりで迷惑をかけてきましたが、ようやく一つ成果が実りました。大学院卒業後からは、少しずつ恩返しをさせて下さい。本当にありがとう御座いました。

#### 私の妹 米澤 彩香 氏

私が高校一年生で骨髄異形成症候群を発症した際に、快く骨髄移植のドナーを引き受けてくれた事本当にありがとう。感謝をしても仕切れませんが今こうして人一倍元気に、そして楽しく生活する機会をくれたこと深謝致します。また、移植後は風邪も引きにくくなり、強い造血幹細胞をくれたことも感謝致します。これからたくさん恩返しをするので、楽しみにしててください。本当にありがとう御座いました。

最後になりますが、これまで大学院及び研究生活を支えてくださった全ての方々に心より感謝申し上げます。また、この研究活動を行うにあたって、気力そして体力ともに途中で疲れ果てる事なくついて来てくれた自分自身にも感謝申し上げ結びとさせていただきます。

## 引用文献

※ 引用文献はアルファベット順であり、論文中に筆頭著者名と発表年を記載した。

1. Ahmed, S.F., Buetow, L., Gabrielsen, M., Lilla, S., Chatrin, C., Sibbet, G.J., Zanivan, S., and Huang, D.T. (2020). DELTEX2 C-terminal domain recognizes and recruits ADP-ribosylated proteins for ubiquitination. *Sci Adv* 6.
2. Arnstein, H.R., Cox, R.A., and Hunt, J.A. (1964). The function of high-molecular-weight ribonucleic acid from rabbit reticulocytes in haemoglobin biosynthesis. *Biochem J* 92, 648-661.
3. Banerji, S., Cibulskis, K., Rangel-Escareno, C., Brown, K.K., Carter, S.L., Frederick, A.M., Lawrence, M.S., Sivachenko, A.Y., Sougnez, C., Zou, L., *et al.* (2012). Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 486, 405-409.
4. Behrens, K., Trivai, I., Schwieger, M., Tekin, N., Alawi, M., Spohn, M., Indenbirken, D., Ziegler, M., Müller, U., Alexander, W.S., *et al.* (2016). Runx1 downregulates stem cell and megakaryocytic transcription programs that support niche interactions. *Blood* 127, 3369-3381.
5. Ben-Ami, O., Friedman, D., Leshkowitz, D., Goldenberg, D., Orlovsky, K., Pencovich, N., Lotem, J., Tanay, A., and Groner, Y. (2013). Addiction of t(8;21) and inv(16) acute myeloid leukemia to native RUNX1. *Cell Rep* 4, 1131-1143.
6. Bertrand, J.Y., and Traver, D. (2009). Hematopoietic cell development in the zebrafish embryo. *Curr Opin Hematol* 16, 243-248.
7. Biggs, J.R., Peterson, L.F., Zhang, Y., Kraft, A.S., and Zhang, D.E. (2006). AML1/RUNX1 phosphorylation by cyclin-dependent kinases regulates the degradation of AML1/RUNX1 by the anaphase-promoting complex. *Mol Cell Biol* 26, 7420-7429.
8. Bondeson, D.P., Mares, A., Smith, I.E., Ko, E., Campos, S., Miah, A.H., Mulholland, K.E., Routly, N., Buckley, D.L., Gustafson, J.L., *et al.* (2015). Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs. *Nat Chem Biol* 11, 611-617.
9. Bots, M., Verbrugge, I., Martin, B.P., Salmon, J.M., Ghisi, M., Baker, A., Stanley, K., Shortt, J., Ossenkoppele, G.J., Zuber, J., *et al.* (2014). Differentiation therapy for the treatment of t(8;21) acute myeloid leukemia using histone deacetylase inhibitors. *Blood* 123, 1341-1352.
10. Brady, G., Elgueta Karstegl, C., and Farrell, P.J. (2013). Novel function of the unique N-terminal region of RUNX1c in B cell growth regulation. *Nucleic Acids Res* 41, 1555-1568.
11. Braun, T., and Woollard, A. (2009). RUNX factors in development: lessons from invertebrate model systems. *Blood Cells Mol Dis* 43, 43-48.
12. Bravo, J., Li, Z., Speck, N.A., and Warren, A.J. (2001). The leukemia-associated AML1 (Runx1)-CBF beta complex functions as a DNA-induced molecular clamp. *Nat Struct Biol* 8, 371-378.



13. Chen, C., and Matesic, L.E. (2007). The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 26, 587-604.
14. Chen, M., Zhu, N., Liu, X., Laurent, B., Tang, Z., Eng, R., Shi, Y., Armstrong, S.A., and Roeder, R.G. (2015). JMJD1C is required for the survival of acute myeloid leukemia by functioning as a coactivator for key transcription factors. *Genes Dev* 29, 2123-2139.
15. Chen, M.J., Yokomizo, T., Zeigler, B.M., Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2009). Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 457, 887-891.
16. Chen, Z., Barbi, J., Bu, S., Yang, H.Y., Li, Z., Gao, Y., Jinasena, D., Fu, J., Lin, F., Chen, C., *et al.* (2013). The ubiquitin ligase Stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor Foxp3. *Immunity* 39, 272-285.
17. Chou, F.S., Griesinger, A., Wunderlich, M., Lin, S., Link, K.A., Shrestha, M., Goyama, S., Mizukawa, B., Shen, S., Marcucci, G., *et al.* (2012). The thrombopoietin/MPL/Bcl-xL pathway is essential for survival and self-renewal in human preleukemia induced by AML1-ETO. *Blood* 120, 709-719.
18. Crute, B.E., Lewis, A.F., Wu, Z., Bushweller, J.H., and Speck, N.A. (1996). Biochemical and biophysical properties of the core-binding factor alpha2 (AML1) DNA-binding domain. *J Biol Chem* 271, 26251-26260.
19. Cunningham, L., Finckbeiner, S., Hyde, R.K., Southall, N., Marugan, J., Yedavalli, V.R., Dehdashti, S.J., Reinhold, W.C., Alemu, L., Zhao, L., *et al.* (2012). Identification of benzodiazepine Ro5-3335 as an inhibitor of CBF leukemia through quantitative high throughput screen against RUNX1-CBF $\beta$  interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 14592-14597.
20. Dandekar, D.H., Kumar, M., Ladha, J.S., Ganesh, K.N., and Mitra, D. (2005). A quantitative method for normalization of transfection efficiency using enhanced green fluorescent protein. *Anal Biochem* 342, 341-344.
21. Dang, C.V., Reddy, E.P., Shokat, K.M., and Soucek, L. (2017). Drugging the 'undruggable' cancer targets. *Nat Rev Cancer* 17, 502-508.
22. Das, A., Wei, Y., Pelczar, I., and Hecht, M.H. (2011). Binding of small molecules to cavity forming mutants of a de novo designed protein. *Protein Sci* 20, 702-711.
23. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754.
24. Endo, Y., Osumi, N., and Wakamatsu, Y. (2003). Deltex/Dtx mediates NOTCH signaling in regulation of Bmp4 expression in cranial neural crest formation during avian development. *Dev Growth Differ* 45, 241-248.
25. Erlanson, D.A., McDowell, R.S., and O'Brien, T. (2004). Fragment-based drug discovery. *J Med Chem* 47, 3463-3482.

26. Forbes, S.A., Beare, D., Gunasekaran, P., Leung, K., Bindal, N., Boutselakis, H., Ding, M., Bamford, S., Cole, C., Ward, S., *et al.* (2015). COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* *43*, D805-811.
27. Golub, T.R., Barker, G.F., Bohlander, S.K., Hiebert, S.W., Ward, D.C., Bray-Ward, P., Morgan, E., Raimondi, S.C., Rowley, J.D., and Gilliland, D.G. (1995). Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 4917-4921.
28. Gorgulla, C., Boeszoermyeni, A., Wang, Z.F., Fischer, P.D., Coote, P.W., Padmanabha Das, K.M., Malets, Y.S., Radchenko, D.S., Moroz, Y.S., Scott, D.A., *et al.* (2020). An open-source drug discovery platform enables ultra-large virtual screens. *Nature* *580*, 663-668.
29. Goyama, S., Huang, G., Kurokawa, M., and Mulloy, J.C. (2015). Posttranslational modifications of RUNX1 as potential anticancer targets. *Oncogene* *34*, 3483-3492.
30. Goyama, S., and Mulloy, J.C. (2011). Molecular pathogenesis of core binding factor leukemia: current knowledge and future prospects. *Int J Hematol* *94*, 126-133.
31. Goyama, S., Schibler, J., Cunningham, L., Zhang, Y., Rao, Y., Nishimoto, N., Nakagawa, M., Olsson, A., Wunderlich, M., Link, K.A., *et al.* (2013). Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells. *J Clin Invest* *123*, 3876-3888.
32. Goyama, S., Schibler, J., Gasilina, A., Shrestha, M., Lin, S., Link, K.A., Chen, J., Whitman, S.P., Bloomfield, C.D., Nicolet, D., *et al.* (2016). UBASH3B/Sts-1-CBL axis regulates myeloid proliferation in human preleukemia induced by AML1-ETO. *Leukemia* *30*, 728-739.
33. Goyama, S., Schibler, J., and Mulloy, J.C. (2019). Alternative translation initiation generates the N-terminal truncated form of RUNX1 that retains hematopoietic activity. *Exp Hematol* *72*, 27-35.
34. Grimwade, D., Ivey, A., and Huntly, B.J. (2016). Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* *127*, 29-41.
35. Grossmann, V., Kern, W., Harbich, S., Alpermann, T., Jeromin, S., Schnittger, S., Haferlach, C., Haferlach, T., and Kohlmann, A. (2011). Prognostic relevance of RUNX1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* *96*, 1874-1877.
36. Gu, T.L., Goetz, T.L., Graves, B.J., and Speck, N.A. (2000). Auto-inhibition and partner proteins, core-binding factor beta (CBFbeta) and Ets-1, modulate DNA binding by CBFalpha2 (AML1). *Mol Cell Biol* *20*, 91-103.
37. Harada, H., Harada, Y., Niimi, H., Kyo, T., Kimura, A., and Inaba, T. (2004). High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood* *103*, 2316-2324.
38. Harbers, M. (2014). Wheat germ systems for cell-free protein expression. *FEBS Lett* *588*, 2762-2773.

39. Hoi, C.S., Lee, S.E., Lu, S.Y., McDermitt, D.J., Osorio, K.M., Piskun, C.M., Peters, R.M., Paus, R., and Tumber, T. (2010). Runx1 directly promotes proliferation of hair follicle stem cells and epithelial tumor formation in mouse skin. *Mol Cell Biol* *30*, 2518-2536.
40. Hornbeck, P.V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J.M., Latham, V., and Skrzypek, E. (2015). PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res* *43*, D512-520.
41. Huang, G., Shigesada, K., Ito, K., Wee, H.J., Yokomizo, T., and Ito, Y. (2001). Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *EMBO J* *20*, 723-733.
42. Huang, G., Zhang, P., Hirai, H., Elf, S., Yan, X., Chen, Z., Koschmieder, S., Okuno, Y., Dayaram, T., Gowney, J.D., *et al.* (2008). PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nat Genet* *40*, 51-60.
43. Huang, G., Zhao, X., Wang, L., Elf, S., Xu, H., Sashida, G., Zhang, Y., Liu, Y., Lee, J., Menendez, S., *et al.* (2011). The ability of MLL to bind RUNX1 and methylate H3K4 at PU.1 regulatory regions is impaired by MDS/AML-associated RUNX1/AML1 mutations. *Blood* *118*, 6544-6552.
44. Huang, H., Woo, A.J., Waldon, Z., Schindler, Y., Moran, T.B., Zhu, H.H., Feng, G.S., Steen, H., and Cantor, A.B. (2012). A Src family kinase-Shp2 axis controls RUNX1 activity in megakaryocyte and T-lymphocyte differentiation. *Genes Dev* *26*, 1587-1601.
45. Ichikawa, M., Asai, T., Saito, T., Seo, S., Yamazaki, I., Yamagata, T., Mitani, K., Chiba, S., Ogawa, S., Kurokawa, M., *et al.* (2004). AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* *10*, 299-304.
46. Illendula, A., Gilmour, J., Grembecka, J., Tirumala, V.S.S., Boulton, A., Kuntimaddi, A., Schmidt, C., Wang, L., Pulikkan, J.A., Zong, H., *et al.* (2016). Small Molecule Inhibitor of CBF $\beta$ -RUNX Binding for RUNX Transcription Factor Driven Cancers. *EBioMedicine* *8*, 117-131.
47. Imai, Y., Kurokawa, M., Izutsu, K., Hangaishi, A., Takeuchi, K., Maki, K., Ogawa, S., Chiba, S., Mitani, K., and Hirai, H. (2000). Mutations of the AML1 gene in myelodysplastic syndrome and their functional implications in leukemogenesis. *Blood* *96*, 3154-3160.
48. Imai, Y., Kurokawa, M., Yamaguchi, Y., Izutsu, K., Nitta, E., Mitani, K., Satake, M., Noda, T., Ito, Y., and Hirai, H. (2004). The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol Cell Biol* *24*, 1033-1043.
49. Inoue, K., Ozaki, S., Shiga, T., Ito, K., Masuda, T., Okado, N., Iseda, T., Kawaguchi, S., Ogawa, M., Bae, S.C., *et al.* (2002). Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nat Neurosci* *5*, 946-954.
50. Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y., and Handa, H. (2010). Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* *327*, 1345-1350.

51. Ito, Y., Bae, S.C., and Chuang, L.S. (2015). The RUNX family: developmental regulators in cancer. *Nat Rev Cancer* 15, 81-95.
52. Jacob, B., Osato, M., Yamashita, N., Wang, C.Q., Taniuchi, I., Littman, D.R., Asou, N., and Ito, Y. (2010). Stem cell exhaustion due to Runx1 deficiency is prevented by Evi5 activation in leukemogenesis. *Blood* 115, 1610-1620.
53. Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C.J., Braun, D., Baaske, P., and Duhr, S. (2011). Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol* 9, 342-353.
54. Jones, D.C., Wein, M.N., Oukka, M., Hofstaetter, J.G., Glimcher, M.J., and Glimcher, L.H. (2006). Regulation of adult bone mass by the zinc finger adapter protein Schnurri-3. *Science* 312, 1223-1227.
55. Khan, S., Zhang, X., Lv, D., Zhang, Q., He, Y., Zhang, P., Liu, X., Thummuri, D., Yuan, Y., Wiegand, J.S., *et al.* (2019). A selective BCL-X. *Nat Med* 25, 1938-1947.
56. Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.
57. Kigawa, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Matsuda, T., Nakajima, R., Tanaka, A., and Yokoyama, S. (2004). Preparation of Escherichia coli cell extract for highly productive cell-free protein expression. *J Struct Funct Genomics* 5, 63-68.
58. Kitabayashi, I., Aikawa, Y., Nguyen, L.A., Yokoyama, A., and Ohki, M. (2001). Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein. *EMBO J* 20, 7184-7196.
59. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., *et al.* (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764.
60. Krämer, O.H., Müller, S., Buchwald, M., Reichardt, S., and Heinzl, T. (2008). Mechanism for ubiquitylation of the leukemia fusion proteins AML1-ETO and PML-RARalpha. *FASEB J* 22, 1369-1379.
61. Krönke, J., Udeshi, N.D., Narla, A., Grauman, P., Hurst, S.N., McConkey, M., Svinkina, T., Heckl, D., Comer, E., Li, X., *et al.* (2014). Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* 343, 301-305.
62. Kuvardina, O.N., Herglotz, J., Kolodziej, S., Kohrs, N., Herkt, S., Wojcik, B., Oellerich, T., Corso, J., Behrens, K., Kumar, A., *et al.* (2015). RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. *Blood* 125, 3570-3579.

63. Lancrin, C., Sroczynska, P., Stephenson, C., Allen, T., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2009). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 457, 892-895.
64. Le Beau, M.M., Larson, R.A., Bitter, M.A., Vardiman, J.W., Golomb, H.M., and Rowley, J.D. (1983). Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogenetic-clinicopathological association. *N Engl J Med* 309, 630-636.
65. Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2006). T cells develop normally in the absence of both Deltex1 and Deltex2. *Mol Cell Biol* 26, 7358-7371.
66. Levanon, D., Bettoun, D., Harris-Cerruti, C., Woolf, E., Negreanu, V., Eilam, R., Bernstein, Y., Goldenberg, D., Xiao, C., Fliegau, M., *et al.* (2002). The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *EMBO J* 21, 3454-3463.
67. Levanon, D., Glusman, G., Bangsow, T., Ben-Asher, E., Male, D.A., Avidan, N., Bangsow, C., Hattori, M., Taylor, T.D., Taudien, S., *et al.* (2001). Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene* 262, 23-33.
68. Li, X., Huang, M., Zheng, H., Wang, Y., Ren, F., Shang, Y., Zhai, Y., Irwin, D.M., Shi, Y., Chen, D., *et al.* (2008). CHIP promotes Runx2 degradation and negatively regulates osteoblast differentiation. *J Cell Biol* 181, 959-972.
69. Lin, S., Mulloy, J.C., and Goyama, S. (2017). RUNX1-ETO Leukemia. *Adv Exp Med Biol* 962, 151-173.
70. Linggi, B., Müller-Tidow, C., van de Locht, L., Hu, M., Nip, J., Serve, H., Berdel, W.E., van der Reijden, B., Quelle, D.E., Rowley, J.D., *et al.* (2002). The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 8, 743-750.
71. Link, K.A., Chou, F.S., and Mulloy, J.C. (2010). Core binding factor at the crossroads: determining the fate of the HSC. *J Cell Physiol* 222, 50-56.
72. Lithwick, G., and Margalit, H. (2003). Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. *Genome Res* 13, 2665-2673.
73. Liu, X., Zhang, Q., Zhang, D.E., Zhou, C., Xing, H., Tian, Z., Rao, Q., Wang, M., and Wang, J. (2009). Overexpression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis. *Leukemia* 23, 739-745.
74. Look, A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278, 1059-1064.

75. Lukasik, S.M., Zhang, L., Corpora, T., Tomanicek, S., Li, Y., Kundu, M., Hartman, K., Liu, P.P., Laue, T.M., Biltonen, R.L., *et al.* (2002). Altered affinity of CBF beta-SMMHC for Runx1 explains its role in leukemogenesis. *Nat Struct Biol* 9, 674-679.
76. Luo, D., de Morree, A., Boutet, S., Quach, N., Natu, V., Rustagi, A., and Rando, T.A. (2017). Deltex2 represses MyoD expression and inhibits myogenic differentiation by acting as a negative regulator of Jmjd1c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E3071-E3080.
77. Lutterbach, B., Westendorf, J.J., Linggi, B., Isaac, S., Seto, E., and Hiebert, S.W. (2000). A mechanism of repression by acute myeloid leukemia-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia. *J Biol Chem* 275, 651-656.
78. Maki, K., Sasaki, K., Sugita, F., Nakamura, Y., and Mitani, K. (2012). Acute myeloid leukemia with t(7;21)(q11.2;q22) expresses a novel, reversed-sequence RUNX1-DTX2 chimera. *Int J Hematol* 96, 268-273.
79. Malakhov, M.P., Mattern, M.R., Malakhova, O.A., Drinker, M., Weeks, S.D., and Butt, T.R. (2004). SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics* 5, 75-86.
80. Martinez Molina, D., Jafari, R., Ignatushchenko, M., Seki, T., Larsson, E.A., Dan, C., Sreekumar, L., Cao, Y., and Nordlund, P. (2013). Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science* 341, 84-87.
81. McCoull W, Cheung T, Anderson E, Barton P, Burgess J, Byth K, Cao Q, Castaldi MP, Chen H, Chiarparin E *et al* (2018) Development of a Novel B-Cell Lymphoma 6 (BCL6) PROTAC To Provide Insight into Small Molecule Targeting of BCL6. *ACS Chem Biol* 13: 3131-3141
82. Metzeler, K.H., Herold, T., Rothenberg-Thurley, M., Amler, S., Sauerland, M.C., Görlich, D., Schneider, S., Konstandin, N.P., Dufour, A., Bräundl, K., *et al.* (2016). Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 128, 686-698.
83. Miller, J., Horner, A., Stacy, T., Lowrey, C., Lian, J.B., Stein, G., Nuckolls, G.H., and Speck, N.A. (2002). The core-binding factor beta subunit is required for bone formation and hematopoietic maturation. *Nat Genet* 32, 645-649.
84. Mitani, K., Ogawa, S., Tanaka, T., Miyoshi, H., Kurokawa, M., Mano, H., Yazaki, Y., Ohki, M., and Hirai, H. (1994). Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia. *EMBO J* 13, 504-510.
85. Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y., and Ohki, M. (1991). t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10431-10434.

86. Morita, K., Suzuki, K., Maeda, S., Matsuo, A., Mitsuda, Y., Tokushige, C., Kashiwazaki, G., Taniguchi, J., Maeda, R., Noura, M., *et al.* (2017). Genetic regulation of the RUNX transcription factor family has antitumor effects. *J Clin Invest* *127*, 2815-2828.
87. Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* *7*, 1063-1066.
88. Mossessova, E., and Lima, C.D. (2000). Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell* *5*, 865-876.
89. Mulloy, J.C., Cammenga, J., Berguido, F.J., Wu, K., Zhou, P., Comenzo, R.L., Jhanwar, S., Moore, M.A., and Nimer, S.D. (2003). Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34+ hematopoietic cells using a single genetic element. *Blood* *102*, 4369-4376.
90. Mulloy, J.C., Cammenga, J., MacKenzie, K.L., Berguido, F.J., Moore, M.A., and Nimer, S.D. (2002). The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* *99*, 15-23.
91. Navarro-Montero, O., Ayllon, V., Lamolda, M., López-Onieva, L., Montes, R., Bueno, C., Ng, E., Guerrero-Carreno, X., Romero, T., Romero-Moya, D., *et al.* (2017). RUNX1c Regulates Hematopoietic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Possibly in Cooperation with Proinflammatory Signaling. *Stem Cells* *35*, 2253-2266.
92. Nevadunsky, N.S., Barbieri, J.S., Kwong, J., Merritt, M.A., Welch, W.R., Berkowitz, R.S., and Mok, S.C. (2009). RUNX3 protein is overexpressed in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* *112*, 325-330.
93. Newick, K., Cunniff, B., Preston, K., Held, P., Arbiser, J., Pass, H., Mossman, B., Shukla, A., and Heintz, N. (2012). Peroxiredoxin 3 is a redox-dependent target of thiostrepton in malignant mesothelioma cells. *PLoS One* *7*, e39404.
94. Nucifora, G., Begy, C.R., Kobayashi, H., Roulston, D., Claxton, D., Pedersen-Bjergaard, J., Parganas, E., Ihle, J.N., and Rowley, J.D. (1994). Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21)(q26;q22) translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 4004-4008.
95. Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., and Tanaka, K. (2016). The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF-κB Signaling. *Mol Cell* *64*, 251-266.
96. Ohtake, F., Saeki, Y., Sakamoto, K., Ohtake, K., Nishikawa, H., Tsuchiya, H., Ohta, T., Tanaka, K., and Kanno, J. (2015). Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep* *16*, 192-201.

97. Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S.W., Grosveld, G., and Downing, J.R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321-330.
98. Osato, M. (2014). An unsung runt 6e isoform for HSC expansion. *Blood* 123, 3684-3686.
99. Patel, P.H., Dutta, D., and Edgar, B.A. (2015). Niche appropriation by Drosophila intestinal stem cell tumours. *Nat Cell Biol* 17, 1182-1192.
100. Peng, R., Zhang, P.F., Yang, X., Wei, C.Y., Huang, X.Y., Cai, J.B., Lu, J.C., Gao, C., Sun, H.X., Gao, Q., *et al.* (2019). Overexpression of RNF38 facilitates TGF- $\beta$  signaling by Ubiquitinating and degrading AHNAK in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 38, 113.
101. Pietras, E.M., Reynaud, D., Kang, Y.A., Carlin, D., Calero-Nieto, F.J., Leavitt, A.D., Stuart, J.M., Göttgens, B., and Passegué, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* 17, 35-46.
102. Podobnik, M., Kraševac, N., Bedina Zavec, A., Naneh, O., Flašker, A., Caserman, S., Hodnik, V., and Anderluh, G. (2016). How to Study Protein-protein Interactions. *Acta Chim Slov* 63, 424-439.
103. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.
104. Rao, L., Sha, Y., and Eissa, N.T. (2017). The E3 ubiquitin ligase STUB1 regulates autophagy and mitochondrial biogenesis by modulating TFEB activity. *Mol Cell Oncol* 4, e1372867.
105. Rudolph, M.J., and Gergen, J.P. (2001). DNA-binding by Ig-fold proteins. *Nat Struct Biol* 8, 384-386.
106. Sakurai, H., Harada, Y., Ogata, Y., Kagiya, Y., Shingai, N., Doki, N., Ohashi, K., Kitamura, T., Komatsu, N., and Harada, H. (2017). Overexpression of. *Blood Adv* 1, 1382-1386.
107. Sanjana, N.E., Shalem, O., and Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 11, 783-784.
108. Sha, Y., Rao, L., Settembre, C., Ballabio, A., and Eissa, N.T. (2017). STUB1 regulates TFEB-induced autophagy-lysosome pathway. *EMBO J* 36, 2544-2552.
109. Shang, Y., Xu, X., Duan, X., Guo, J., Wang, Y., Ren, F., He, D., and Chang, Z. (2014). Hsp70 and Hsp90 oppositely regulate TGF- $\beta$  signaling through CHIP/Stub1. *Biochem Biophys Res Commun* 446, 387-392.
110. Shang, Y., Zhao, X., Xu, X., Xin, H., Li, X., Zhai, Y., He, D., Jia, B., Chen, W., and Chang, Z. (2009). CHIP functions an E3 ubiquitin ligase of Runx1. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 242-246.



111. Sheren, J.E., and Kassenbrock, C.K. (2013). RNF38 encodes a nuclear ubiquitin protein ligase that modifies p53. *Biochem Biophys Res Commun* 440, 473-478.
112. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185, 60-89.
113. Ślabicki, M., Yoon, H., Koeppl, J., Nitsch, L., Roy Burman, S.S., Di Genua, C., Donovan, K.A., Sperling, A.S., Hunkeler, M., Tsai, J.M., *et al.* (2020). Small-molecule-induced polymerization triggers degradation of BCL6. *Nature* 588, 164-168.
114. Tahirov, T.H., Inoue-Bungo, T., Morii, H., Fujikawa, A., Sasaki, M., Kimura, K., Shiina, M., Sato, K., Kumasaka, T., Yamamoto, M., *et al.* (2001). Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBFbeta. *Cell* 104, 755-767.
115. Takahashi, H., Nozawa, A., Seki, M., Shinozaki, K., Endo, Y., and Sawasaki, T. (2009). A simple and high-sensitivity method for analysis of ubiquitination and polyubiquitination based on wheat cell-free protein synthesis. *BMC Plant Biol* 9, 39.
116. Takahashi, H., Uematsu, A., Yamanaka, S., Imamura, M., Nakajima, T., Doi, K., Yasuoka, S., Takahashi, C., Takeda, H., and Sawasaki, T. (2016). Establishment of a Wheat Cell-Free Synthesized Protein Array Containing 250 Human and Mouse E3 Ubiquitin Ligases to Identify Novel Interaction between E3 Ligases and Substrate Proteins. *PLoS One* 11, e0156718.
117. Tan CSH, Go KD, Bisteau X, Dai L, Yong CH, Prabhu N, Ozturk MB, Lim YT, Sreekumar L, Lengqvist J *et al* (2018) Thermal proximity coaggregation for system-wide profiling of protein complex dynamics in cells. *Science* 359: 1170-1177
118. Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G., and Neckers, L. (2010). Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 537-549.
119. Trott, O., and Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31, 455-461.
120. Tsuchiya H, Tanaka K, Saeki Y (2013) The parallel reaction monitoring method contributes to a highly sensitive polyubiquitin chain quantification. *Biochem Biophys Res Commun* 436: 223-229
121. Ullman, E.F., Kirakossian, H., Singh, S., Wu, Z.P., Irvin, B.R., Pease, J.S., Switchenko, A.C., Irvine, J.D., Dafforn, A., and Skold, C.N. (1994). Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5426-5430.
122. Vu, L.P., Perna, F., Wang, L., Voza, F., Figueroa, M.E., Tempst, P., Erdjument-Bromage, H., Gao, R., Chen, S., Paietta, E., *et al.* (2013). PRMT4 blocks myeloid differentiation by assembling a methyl-RUNX1-dependent repressor complex. *Cell Rep* 5, 1625-1638.

123. Wang, C.Q., Jacob, B., Nah, G.S., and Osato, M. (2010). Runx family genes, niche, and stem cell quiescence. *Blood Cells Mol Dis* 44, 275-286.
124. Wang, L., Huang, G., Zhao, X., Hatlen, M.A., Vu, L., Liu, F., and Nimer, S.D. (2009). Post-translational modifications of Runx1 regulate its activity in the cell. *Blood Cells Mol Dis* 43, 30-34.
125. Warren AJ, Bravo J, Williams RL, Rabbitts TH (2000) Structural basis for the heterodimeric interaction between the acute leukaemia-associated transcription factors AML1 and CBFbeta. *EMBO J* 19: 3004-3015
126. Wesely, J., Kotini, A.G., Izzo, F., Luo, H., Yuan, H., Sun, J., Georgomanoli, M., Zviran, A., Deslauriers, A.G., Dusaj, N., *et al.* (2020). Acute Myeloid Leukemia iPSCs Reveal a Role for RUNX1 in the Maintenance of Human Leukemia Stem Cells. *Cell Rep* 31, 107688.
127. Willcockson, M.A., Taylor, S.J., Ghosh, S., Healton, S.E., Wheat, J.C., Wilson, T.J., Steidl, U., and Skoultschi, A.I. (2019). Runx1 promotes murine erythroid progenitor proliferation and inhibits differentiation by preventing Pu.1 downregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 17841-17847.
128. Winter, G.E., Buckley, D.L., Paulk, J., Roberts, J.M., Souza, A., Dhe-Paganon, S., and Bradner, J.E. (2015). DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science* 348, 1376-1381.
129. Yamaguchi, Y., Kurokawa, M., Imai, Y., Izutsu, K., Asai, T., Ichikawa, M., Yamamoto, G., Nitta, E., Yamagata, T., Sasaki, K., *et al.* (2004). AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues. *J Biol Chem* 279, 15630-15638.
130. Yang, G., Khalaf, W., van de Locht, L., Jansen, J.H., Gao, M., Thompson, M.A., van der Reijden, B.A., Gutmann, D.H., Delwel, R., Clapp, D.W., *et al.* (2005). Transcriptional repression of the Neurofibromatosis-1 tumor suppressor by the t(8;21) fusion protein. *Mol Cell Biol* 25, 5869-5879.
131. Yang, G., Thompson, M.A., Brandt, S.J., and Hiebert, S.W. (2007). Histone deacetylase inhibitors induce the degradation of the t(8;21) fusion oncoprotein. *Oncogene* 26, 91-101.
132. Yonezawa, T., Takahashi, H., Shikata, S., Liu, X., Tamura, M., Asada, S., Fukushima, T., Fukuyama, T., Tanaka, Y., Sawasaki, T., *et al.* (2017). The ubiquitin ligase STUB1 regulates stability and activity of RUNX1 and RUNX1-RUNX1T1. *J Biol Chem* 292, 12528-12541.
133. Yonezawa, T., Takahashi, H., Shikata, S., Sawasaki, T., Kitamura, T., and Goyama, S. (2018). The ubiquitin ligase RNF38 promotes RUNX1 ubiquitination and enhances RUNX1-mediated suppression of erythroid transcription program. *Biochem Biophys Res Commun* 505, 905-909.
134. Zhang, D.E., Hetherington, C.J., Meyers, S., Rhoades, K.L., Larson, C.J., Chen, H.M., Hiebert, S.W., and Tenen, D.G. (1996). CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol Cell Biol* 16, 1231-1240.

135. Zhang, H., Amick, J., Chakravarti, R., Santarriaga, S., Schlanger, S., McGlone, C., Dare, M., Nix, J.C., Scaglione, K.M., Stuehr, D.J., *et al.* (2015). A bipartite interaction between Hsp70 and CHIP regulates ubiquitination of chaperoned client proteins. *Structure* 23, 472-482.
136. Zhang, L., Li, Q., Xu, J., Sun, G., and Xu, Z. (2020). Cimetidine promotes STUB1-mediated degradation of tumoral FOXP3 by activating PI3K-Akt pathway in gastric cancer. *Ann Transl Med* 8, 1304.
137. Zhao, X., Jankovic, V., Gural, A., Huang, G., Pardanani, A., Menendez, S., Zhang, J., Dunne, R., Xiao, A., Erdjument-Bromage, H., *et al.* (2008). Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev* 22, 640-653.