

(3.21)転座による AML1/Evi-1 融合

蛋白質の造腫瘍性の検討

指導教官 矢野敬雄教授

東京大学大学院経済学系研究科

平成3年4月入学

第三種博士課程

第1期卒業等専攻

黒川 輝 夫

①

論文題目

t(3;21) 転座による AML1/Evi-1 融合
蛋白質の造腫瘍性の検討

指導教官名 矢崎 義雄 教授

平成3年4月

東京大学大学院医学系研究科

第三種博士課程（医学）

第1臨床医学専攻入学

氏名 黒川 峰夫

目次

I 緒言	1
II 方法	
1. 培養細胞	6
2. プラスミドの構築	6
3. ウィルス感染と軟寒天培地アッセイ	8
4. RNA 調整と ノーザンプロット法	10
5. <i>AML1/Evi-1</i> とその欠失変異体のウェスタンプロット法	11
III 結果	
1. <i>AML1/Evi-1</i> 融合蛋白質を安定に発現する線維芽細胞株の樹立	13
2. <i>AML1/Evi-1</i> 融合蛋白質による Rat-1 細胞のトランスフォーメーション	14
3. p210 ^{BCR/ABL} 発現細胞に対する <i>AML1/Evi-1</i> の効果	19
4. <i>AML1/Evi-1</i> のトランスフォーミング活性に寄与する機能領域	23
5. <i>AML1/Evi-1</i> 発現細胞における内因性 c-Jun 蛋白質の発現レベルの上昇	32
IV 考察	34
V 謝辞	42
VI 文献	43

図 1	2
図 2	4
図 3	15
図 4	17
表 1	18
図 5	21
表 2	22
図 6	25
図 6 の説明	26
図 7	27
図 8	29
図 9	30
図 9 の説明	31
図10	33
表 3	35

I 緒言

慢性骨髄性白血病 (CML) は多能性造血幹細胞の異常クローンに由来する進行性の疾患である (1, 2)。典型的な CML の臨床経過は慢性期と急性期に分けられる。慢性期は分化能を保持した幹細胞の増殖で特徴づけられ、数カ月から数年の慢性期の後、大部分の症例が急性転化を経て、未分化な芽球の腫瘍性増殖を特徴とする急性期に至る (3)。腫瘍細胞は $t(9;22)$ 転座による Ph^1 染色体を持ち (4)、これにより BCR/ABL 融合遺伝子が形成される (5)。 BCR/ABL 融合遺伝子産物は 210 kD の蛋白質 ($p210^{BCR/ABL}$) であって、高いキナーゼ活性を有し (6)、マウスの *in vivo* での骨髄再構成の実験において、単独で直接に白血病を惹起しうることを示されている (7)。急性期の白血病細胞には付加的な染色体異常をしばしば認め、第 2 の遺伝子変化が急性期への進展に関与していることが示唆される (8)。しかし現在までのところ、具体的な急性転化の分子機構はほとんど明らかにされていない。

3番染色体と21番染色体の相互転座 ($t(3;21)$ 転座) は CML の急性転化時に特徴的に出現する付加的染色体異常の一つである (図 1) (9-11)。文献的には $t(3;21)$ 転座は現在までに 33 例の報告がある。疾患別に見ると CML の急性転化で 12 例、2 次性白血病あるいは 2 次性骨髄異形成症候群で 11

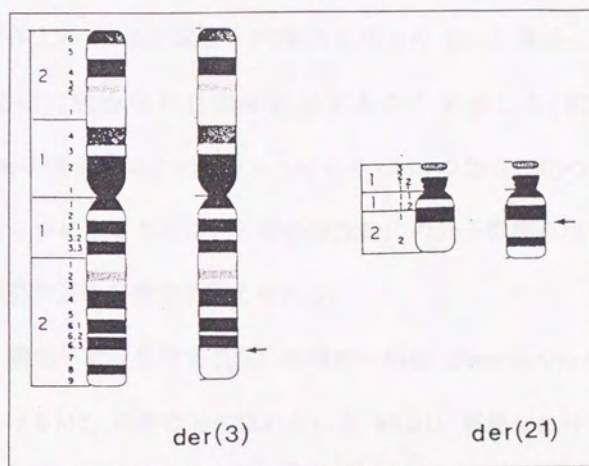


図1 $t(3;21)(q26;q21)$ 転座

例と比較的多数の報告を認めるのに対して、CMLの慢性期では5例、先行疾患のない骨髓異形成症候群や白血病ではそれぞれ3例、2例と報告数が少ない(9-12)。したがって $t(3;21)$ 転座の形成は、造血幹細胞に起因する疾患が急性白血病の状態に進展する際に重要な役割を担っていると考えられている(13)。筆者は既に三谷らと共同で $t(3;21)$ 転座によって21番染色体上の *AML1* 遺伝子が3番染色体上の *Evi-1* 遺伝子と融合し、*AML1/Evi-1* 融合転写産物を形成することを示した(図2)(14)。*AML1/Evi-1* 融合遺伝子がどのようにしてCMLの急性転化の成因に関わるかを明らかにすることは、一般の急性転化の分子機構を理解する上で極めて重要な意味を持つと考えられる。

AML1 遺伝子は、急性骨髓性白血病の一病型 (French-American-British 分類におけるM2) に特徴的に認められる $t(8;21)$ 転座における21番染色体上の切断点に存在する遺伝子として単離されたものである(15)。*AML1* 蛋白質は128アミノ酸にわたって、*Drosophila* の体節形成遺伝子である *runt* と高い相同性を有している(図2)(16)。この領域は Runt-domain と呼ばれ(17)、系統発生的に保存されており、機能的には DNA 結合能と蛋白質結合能を有している。 $t(3;21)$ 転座による *AML1* 蛋白質の切断点はその Runt-domain の直下であり、その結果形成される *AML1/*

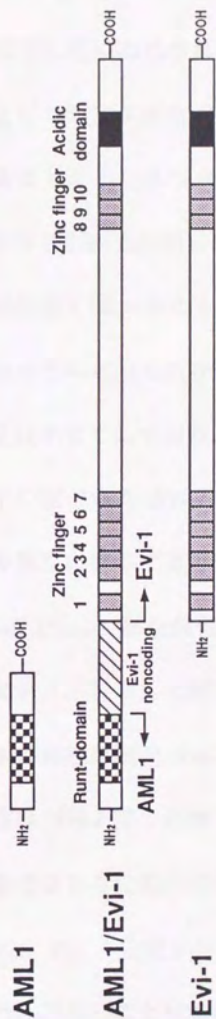


図2 AML1/Evi-1 融合蛋白質の構造

Evi-1 融合蛋白質はその分子内にRunt-domainを保持している (14)。

Evi-1 (ectopic viral integration site 1) 遺伝子は、AKXD マウスの骨髓性白血病において高頻度に見いだされるレトロウイルス挿入部位の近傍に存在する遺伝子として同定された (18)。*Evi-1* は DNA 結合能を有する核内蛋白質であることが知られており、2 つの領域に分かれた10個の zinc finger 構造を持つ (図 2) (19-21)。*Evi-1* はマウスとヒトの骨髓性白血病にて高頻度には発現していることが知られているが、マウスの正常骨髓細胞では発現はほとんど見られない (20-24)。*AML1/Evi-1* 融合遺伝子には *Evi-1* の全長が含まれており、転座によって *AML1* 遺伝子のプロモーターの支配下に置かれた *Evi-1* 遺伝子の造血細胞における異所性の発現が、白血病の発症に寄与する可能性が考えられている (25)。

今回、筆者は *AML1/Evi-1* 融合遺伝子の造腫瘍性を繊維芽細胞に対するトランスフォーミング活性として評価した。具体的には *AML1/Evi-1* 融合遺伝子がラットの線維芽細胞 Rat-1 に対して足場非依存性増殖刺激能を持ち、その活性は *Evi-1* 部分の第 2 zinc finger 領域に依存することを明らかにした。筆者はさらに転写活性因子の AP1 の主要構成要素である c-Jun 蛋白質 (26, 27) の発現レベルが *AML1/Evi-1* によって影響を受けることを示した。以上のことについて述べてみたい。

II 材料と方法

1. 培養細胞

Rat-1、 NIH 3T3 及びそれに由来する細胞株は、特に示さない限りすべて 5% ウシ胎児血清 (FCS)、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地中で 37°C、5% CO₂ 環境下で継代した。COS7 及びそれに由来する細胞は 10% FCS、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン添加 DMEM 培地中で 37°C、5% CO₂ 環境下で継代した。SKH1 細胞は 10% FCS、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン添加 RPMI 培地中で 37°C、5% CO₂ 環境下で継代した。

2. プラスミドの構築

AML1/Evi-1 とそれに由来するプラスミドは以下のようにして構築した。AML1/Evi-1 をコードする cDNA の全長は SKH1 細胞の cDNA ライブラリより、すでに他で述べられたようにして単離した(14)。pSR α MSVtkneoは、単純ヘルペスウィルスのチミジンキナーゼ遺伝子のプロモータを用いて、バクテリアのネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を哺乳動物

細胞で発現することのできるレトロウィルスベクターである(28)。まず *AML1/Evi-1* の全長を含む 4.1 kb の *EcoRI* 断片を *Tth111I* で消化することによりポリA付加シグナルをあらかじめ除去した。次に、得られた4.0 kb の断片を pSR α MSVtkneo の 5' LTRの下流に位置する *EcoRI* 部位に導入し、*AML1/Evi-1* を発現することのできるレトロウィルスベクターを作成した。*AML1/Evi-1* の欠失変異体の作成は、すでに他で述べられたようにして行った (29; Tanaka, submitted)。簡潔に述べると、まず *Evi-1* の cDNA は SKH1 細胞由来の *AML1/Evi-1* の cDNA から作成した。得られた *Evi-1* の cDNA の塩基配列は、Morishita らが既に得ていたものと本質的に同一であることが確認された (21)。この *Evi-1* 上の翻訳開始部位から 2521 番目の塩基の位置に部位特異的変異導入法によって *EcoRV* の認識配列を作成した。そして 2194 番目の塩基部位に認識配列を持つ *Eco47III* と 2521 番目に認識部位を作成した *EcoRV* で *Evi-1* を消化することによって、内部の第2 zinc finger 領域を取り除いて *Evi-1Δ(Z8-10)* を作成した。また 2194 番目の *Eco47III* と 2986 番目の *AflIII* で消化することにより第2 zinc finger 領域と acidic domain を取り除いて *Evi-1Δ(Z8-10+AD)* を作成した。acidic domain を欠く *Evi-1ΔC-end* は 2541 番目の *AsuII* で消化することにより C 端を切り落として作成した。これらの

Evi-1 の欠失変異体を *AML1/Evi-1* の cDNA より調整した *AML1* の断片とそれぞれ結合させることによって *AML1/Evi-1Δ(Z8-10)*、*AML1/Evi-1(Z8-10+AD)*、*AML1/Evi-1ΔC-end* を作成した。*AML1/Evi-1ΔRD* は *AML1/Evi-1* の cDNA 上の Runt-domain 開始部位に部位特異的変異導入法によって *ApaI* 認識部位を導入し、もともと Runt-domain 終了部位に *ApaI* 認識部位が存在することを利用して、*ApaI* による消化で Runt-domain を取り除くことによって作成した。各々の *AML1/Evi-1* の変異体は上と同様にして pSR α MSVtkneo の *EcoRI* 部位に導入した。

Blasticidin S (BS) 耐性遺伝子 (*bsr*) を選択マーカーに持つ哺乳動物細胞発現ベクター pGD*bsr* は、以下のようにして作成した。*neo* を有する哺乳動物細胞発現ベクターである pGD (7) から *neo* の断片を除き、代わりに pSV2*bsr* (30) より切り出した *bsr* の断片を挿入し、内在の SV40 プロモータによって *bsr* を発現するように構築した。

3. ウィルス感染と軟寒天培地アッセイ

非増殖性のレトロウィルス培養上清は、COS7 細胞にてレトロウィルスを一過性に高発現をさせることによって作成した(28)。DEAE-dextran 法を用いて *AML1/Evi-1* あるいはその変異体をを含む pSR α MSVtkneo

と ψ -パッケージングプラスミドを同時に COS7 細胞に導入した (31)。
その結果として放出されたウィルスが含まれる COS7 細胞の培養上清を
回収し、 -80°C にて保存した。ウィルス含有上清のタイターは NIH 3T3
細胞に感染させた後 G418 含有選択培地で培養し、G418 抵抗性コロニー
を算定することによって測定し、以後の培養細胞への感染操作の前に
あらかじめ均一化した。培養細胞へのウィルス感染は、 37°C で $8\mu\text{g/ml}$
の Polybrene 存在下にてウィルス含有上清を細胞に暴露することによっ
て行った。暴露開始から 48 時間後より $800\mu\text{g/ml}$ の G418 存在下で培養
することにより、G418 抵抗性の細胞集団を選択した。

軟寒天培地アッセイは以下のようにして行った。トリプシン処理にて
培養皿から剥離した培養細胞を 0.3% の軟寒天と 20% または 5% のウシ
胎児血清を含む DMEM 培地に浮遊させた。この細胞浮遊液を 0.6% の
軟寒天と 5% のウシ胎児血清を含む DMEM 培地層の上に静置した。細
胞密度は径 3.5cm のペトリ皿 1 枚当たり 2×10^4 個となるようにし、コ
ロニーの個数は軟寒天培地培養を開始してから 14 日後から 20 日後に算定
した。

4. RNA 調整と ノーザンブロット法

AML1/Evi-1 あるいはその変異体を導入した細胞株の RNA 調整は、以下のようにして行った。培養細胞の総 RNA は phenol-guanidinium isothiocyanate 法によって調整した (32)。polyA⁺ RNA は oligo(dT)-Latex (JSR, Roche) を用いて一段階で選別した。5 μ g の polyA⁺ RNA または 25 μ g の総 RNA を formaldehyde-ararose gel 上の電気泳動で分子量に従って分画し、20 \times SSC (3M NaCl, 300mM sodium citrate) を用いてナイロン膜 (Hybond N, Amersham) に16時間かけて転写し、UV照射 (Spectrolinker, Spectronics Co.)によりRNAを固定することによってフィルターを作成した。prehybridization は、50% formamide, 4 \times SSPE (20 \times SSPE = 3.6M NaCl, 200mM NaH₂PO₄, 20mM EDTA), 5 \times Denhardt's 溶液 (0.1% (w/v) bovine serum albumin, 0.1% (w/v) Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone), 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 400 μ g/ml sonicated salmon testis DNA からなる prehybridization 溶液にて 42 $^{\circ}$ C で 2時間行った。プローブは ³²P を用いて random priming 法で標識した (33)。hybridization は上述の prehybridization 溶液を用いて 42 $^{\circ}$ C で10時間行った。フィルターは 1 \times SSC, 0.1% SDS からなる溶液で 65 $^{\circ}$ C で30分間洗い、オートラジオグラフィーフィルムに感光した。*AML1/Evi-1* に由来する転写産物はヒト *Evi-1*

cDNA の 3' 端の 2.0 kb の断片を用いて検出した (21)。c-jun のプローブはラットの c-jun cDNA の全長から作成した。RNA 量の内因性コントロールとしてラットの GAPDH cDNA をプローブとして hybridization を行った (34, 35)。

5. AML1/Evi-1 とその欠失変異体のウェスタンブロット法

AML1 と Evi-1 に対するポリクローナル抗体は、それぞれの蛋白質とマルトース結合蛋白質との融合体を用いてウサギを免疫することによって作成した (29; Tanaka, submitted)。培養細胞を十分量の phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後、氷上で RIPA lysis buffer (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid, 1% NP-40, 500U/ml urinary trypsin inhibitor, 0.6mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 5mg/ml Leupeptin) を加えて細胞溶解液を作り、10,000 rpm で 5 分間 4℃ にて遠心し、核を取り除いた。Protein Assay Dye (Bio-Rad) を用いて蛋白質の濃度を測定した後、4× sample buffer (0.4M Tris-HCl pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 10% glycerol, 0.04% bromophenol blue) を加え、5 分間煮沸して変性させ、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。SDS-PAGE 後のゲルを 1× Electrode buffer (24mM Tris, 206mM

glycine, 5% methanol) に浸した後、セミドライ型転写装置 (Trans-Blot SD, Bio-Rad) を用いて、polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon, Millipore) に、130mA 定常電流で2時間かけて転写を行った。10% skim milk を含む 1× TNT buffer (10mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) にてフィルターを洗浄し、1時間ブロッキングを行った。1次抗体として上記の抗AML1 または抗Evi-1 ポリクローナル抗体を 1:200 で、あるいは抗 c-Abl モノクローナル抗体 (Ab3, Oncogene Science) (36) を 1:500 で含む 1× TNT buffer 中で室温にて1時間振とうさせた後、1× TNT buffer で10分間ずつ3回洗浄した。続いて、2次抗体としてアルカリフォスファターゼを結合したヤギ抗ウサギ IgG (L+H) 抗体 (Promega) を 1:7500 で含む 1× TNT buffer に室温で1時間フィルターを振とうさせた後、1× TNT buffer で10分間ずつ3回洗浄した。抗体と結合したフィルター上の蛋白質を可視化するために、1× AP buffer (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) 中で nitroblue tetrazolium-bromochloroindolyl phosphate (Promega) と反応させて発色させた。

III. 結果

1. AML1/Evi-1 融合蛋白質を安定に発現する線維芽細胞株の樹立

筆者は AML1/Evi-1 融合蛋白質の機能解析のため、外来性に AML1/Evi-1 融合遺伝子を細胞に導入し、AML1/Evi-1 融合蛋白質を恒常的に発現する細胞の樹立を行った。一般に遺伝子を細胞に導入する方法としてはDNAトランスフェクション法が最もよく用いられるが、AML1/Evi-1 は正常の細胞には存在しない非生理的な蛋白質なので、その過剰発現は細胞に対して有害な作用を及ぼすことが予想された。したがって筆者は効率的に AML1/Evi-1 を細胞に導入する手段として、レトロウィルスによる遺伝子導入法を用い、それによって AML1/Evi-1 蛋白質を安定に発現する細胞株の確立を試みた。AML1/Evi-1 のメッセージを発現するレトロウィルスを構築するために、AML1/Evi-1 の cDNA の全長からポリ A 付加シグナルを除去し、pSR α MSVtkneo にサブクローニングした。この構築物を ψ -ヘルパーウィルスとともに COS7 細胞において発現させることによって、ヘルパー活性を持たないレトロウィルスを作成した。

Rat-1細胞は平面的な形態を持ち、接触による増殖抑制のかかるラットの線維芽細胞株である。単層培養された Rat-1 細胞にレトロウィルスを

感染させ、感染したクローンを *neo* の発現を示標として G418 存在下で選択した。それぞれの G418 抵抗性コロニーに対して抗 AML1 抗体を用いたウェスタンブロットを行い、AML1/Evi-1 蛋白質の発現を示標にスクリーニングを行った。G418 抵抗性クローンにて、SKH1 細胞において認める AML1/Evi-1 蛋白質と分子量と免疫反応性において同等の蛋白質を発現していることが確認され、それらの細胞株を Rat-1/AE と命名した(図3)。筆者はさらに抗 Evi-1 抗体を用いてウェスタンブロット法を行ったが、やはり分子量において同等の蛋白質の発現を認め、この蛋白質が AML1/Evi-1 蛋白質と同一のものであると考えられた。その発現量は図7において示される COS7 細胞内での発現量に比して 1/3 ~ 1/2 程度であった(データ不掲載)。これらのクローンは数カ月の継代培養を通して、常に AML1/Evi-1 蛋白質を安定して発現した。

2. AML1/Evi-1 融合蛋白質による Rat-1 細胞のトランスフォーメーション

Rat-1/AE 細胞は液体培地においては、形態的に親株の Rat-1 細胞と明らかな差異は認めず、接触による増殖阻害の性質も保持したままであった。しかし Rat-1/AE 細胞は明らかな足場非依存性増殖能を示した。軟

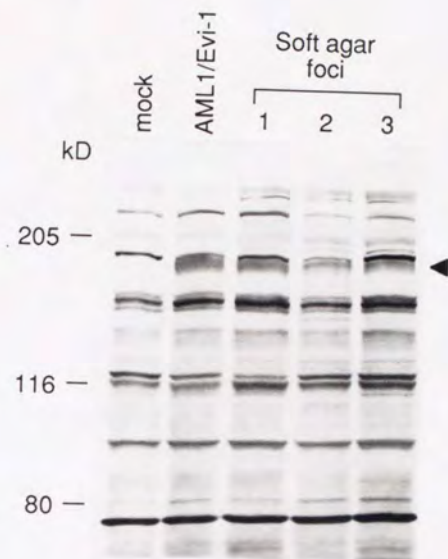


図3 Rat-1 細胞における AML1/Evi-1 融合蛋白質の発現

レトロウイルスにより AML1/Evi-1 を導入した Rat-1 細胞から調整した蛋白質を抗 AML1 抗体を用いてウェスタンブロット法で解析した。最も左のレーンは親株の Rat-1 細胞で、AML1/Evi-1 のレーンはレトロウイルスを感染させ、G418 で選択して得られたクローンのうち代表的なものを示した。soft agar foci の3レーンは、レトロウイルスを感染させた後 soft agar に植え、形成された肉眼的コロニーを細胞株として樹立したもので得た細胞溶解液である。AML1/Evi-1 融合蛋白質の位置を黒矢印で示した。

寒天培地において *neo* のみを感染させた Rat-1 細胞が肉眼では識別が困難な微小なコロニーを形成するに留まったのに対して、Rat-1/AE細胞は軟寒天培地に播種後14日から20日以内に肉眼ではっきり認められる大きさのコロニーを形成した(図4, 表1)。AML1/Evi-1 が軟寒天培地において線維芽細胞の増殖能を変化させうる能力を持つことを確かめるために、Rat-1 細胞に AML1/Evi-1 を含むレトロウィルスを感染させ、感染細胞集団を G418 による選択を加えないで直接軟寒天培地に播種した。これらの感染細胞集団によって軟寒天培地中に形成された肉眼的コロニーを液体培地にて樹立、培養し、AML1/Evi-1 蛋白質の発現を調べたところ、抗 AML1 抗体によるウェスタンブロット法で AML1/Evi-1 蛋白質の発現が確認された(図3)。このことは AML1/Evi-1 融合蛋白質が、Rat-1線維芽細胞の足場非依存性増殖能の獲得に寄与しうることを強く示唆するものである。

上で示した AML1/Evi-1 のトランスフォーミング活性はすべての線維芽細胞に対して認められるわけではなかった。別種の線維芽細胞株である NIH 3T3 細胞に対して、上と同一の AML1/Evi-1 のレトロウィルスを用いて感染実験を行ったところ、軟寒天培地における肉眼的コロニー形成は認められなかった(データ不掲載)。BCR/ABL においてもこれと同



Tk Neo



AML1/Evi-1

図4 Rat-1 細胞の AML1/Evi-1 による transformation を示す軟寒天培地アッセイ

等価のタイターを持つレトロウィルスを感染させた 2×10^4 個の Rat-1 細胞を、5%ウシ胎児血清を含む 0.3%軟寒天培地に播種した。空の tkneo ベクターを感染させた Rat-1 細胞が微少なコロニーを形成するに留まるのに対して、AML1/Evi-1 を感染させた Rat-1 細胞は肉眼的な大きさのコロニーを多数形成した。

表1 AML1/Evi-1 による Rat-1 細胞のトランスフォーメーション

安定発現株	Rat-1 のコロニー数 ^a	
	高血清濃度	低血清濃度
tkneo ^b	5, 5, 15	0, 0
AML1/Evi-1 ^c	240, 335, 383	55, 90

^a 各コロニー数は 3 枚のプレートの平均により決定した。それぞれの安定発現株について 2 個あるいは 3 個の独立したクローンによる値を示した。高血清濃度 (20%) あるいは低血清濃度 (5%) で 1 プレート当たり 2×10^4 個の細胞についてアッセイを行い、 10^5 個の細胞数に対する値に標準化した。

^b 空の pSRαMSVtkneo ベクターを感染させた。

^c pSRαMSVtkneo ベクターを用いて、レトロウイルスによる方法で導入した。

様の実験事実が認められている (37)。

一方 Rat-1/AE 細胞のヌードマウスにおける造腫瘍性は、 5×10^6 個の細胞を移植した系では認められなかった。

3. p210^{BCR/ABL} 発現細胞に対する AML1/Evi-1 の効果

t(3;21) 転座は主に CML の急性転化に伴って現れる染色体異常なので、転座によって形成された融合蛋白質は p210^{BCR/ABL} を発現する細胞に対しても造腫瘍性を発揮しうることが予想される。p210^{BCR/ABL} 発現細胞に対する AML1/Evi-1 の効果を調べることは、実際の血液細胞における急性転化のメカニズムを考える上で重要な意味を持つ。そこで筆者はまず p210^{BCR/ABL} を安定に発現する Rat-1 細胞株を樹立を試みた。前述のように COS7 細胞を用いて作成したヘルパー活性を持たない BCR/ABL のレトロウィルスを Rat-1 細胞に感染させ、G418 で選択することによって G418 抵抗性クローンを確立した。それらのクローンに対して、c-Abl に対するモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法で p210^{BCR/ABL} の発現を検索し、p210^{BCR/ABL} の発現が認められたものを Rat-1/p210 と命名した。Rat-1/p210 細胞はすでに報告されているように、液体培地にてわずかな形態変化を認め、軟寒天培地にて肉眼的コロニー

を形成した (37)。筆者はさらに別の発現ベクター pGDbsr を用いて Rat-1/p210 細胞に *AML1/Evi-1* を導入した。pGDbsr に構築した *AML1/Evi-1* を Rat-1 に対してリン酸カルシウム-DNA 沈殿法 (38) を用いて導入し、BS にて選択した後、BS 抵抗クローンに対して抗 *AML1* 抗体を用いたウェスタンブロット法でスクリーニングを行った。このようにして *AML1/Evi-1* と *BCR/ABL* の両者を同時に発現する Rat-1 の細胞株を樹立した (図5)。そして *AML1/Evi-1* または *BCR/ABL*、あるいはその両者を安定に発現するクローンを軟寒天培地に播種し、トランスフォーミング活性を評価した。その結果、表2に示したように、Rat-1/p210 細胞に *AML1/Evi-1* を導入することによって、トランスフォーメーションの示標となるコロニー形成能の著明な上昇が認められた。*AML1/Evi-1* と *BCR/ABL* の両者を発現するクローンは著しい形態変化は示さなかったが、軟寒天培地において形成されるコロニーの大きさと個数はRat-1/p210 細胞に比して明らかな増大を示し、*AML1/Evi-1* は p210^{*BCR/ABL*} によってトランスフォームした細胞に対してもさらに造腫瘍性を発揮することが判明した。

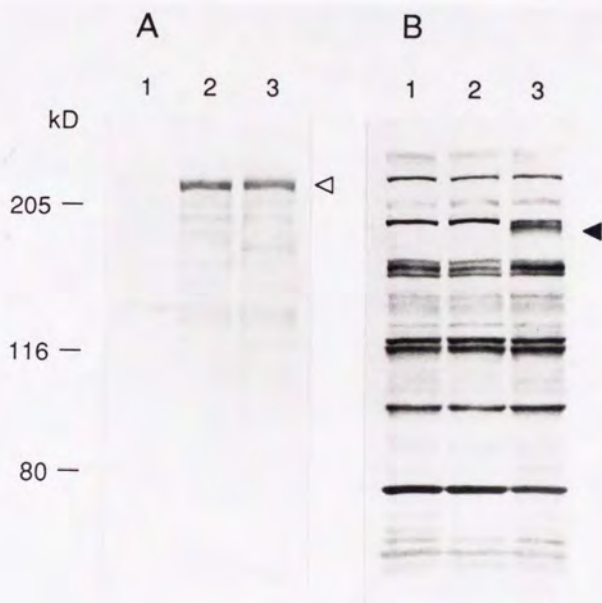


図5 $p210^{BCR/ABL}$ を発現する Rat-1 細胞に対する $AML1/Evi-1$ の導入

BCR/ABL と $AML1/Evi-1$ の両者あるいはどちらか一方を導入した Rat-1 細胞から得た細胞溶解液を抗 AML1 抗体 (A) あるいは抗 Evi-1 抗体 (B) を用いてウェスタンブロット法で解析した。レーン 1 は $pSR\alpha MSVtkneo$ と $pGDbsr$ を導入したクローン、レーン 2 は BCR/ABL と $pGDbsr$ を導入したクローン、レーン 3 は BCR/ABL と $AML1/Evi-1$ の両者を導入したクローンを示す。白矢印は $p210^{BCR/ABL}$ に特異的なバンドの位置を示し、黒矢印は約 180kD の分子量を持つ $AML1/Evi-1$ 融合蛋白質の位置を示す。

表2 BCR/ABL と AML1/Evi-1 による Rat-1 細胞のトランスフォーメーション

安定発現株	Rat-1 のコロニー数 ^a	
	高血清濃度	低血清濃度
tkneo ^b	5, 5, 15	0, 0, 0
BCR/ABL ^c	50, 55, 75	20, 25, 30
BCR/ABL ^c + AML1/Evi-1 ^d	458, 475, 480	90, 115, 165

^a 各コロニー数は3枚のプレートの平均により決定した。それぞれの安定発現株について3個の独立したクローンによる値を示した。高血清濃度 (20%) あるいは低血清濃度 (5%) で1プレート当たり 2×10^4 個の細胞についてアッセイを行い、 10^5 個の細胞数に対する値に標準化した。

^b 空の pSR α MSVtkneo ベクターを感染させた。

^c pSR α MSVtkneo ベクターを用いて、レトロウイルスによる方法で導入した。

^d pGDbsr ベクターを用いて、DNA トランスフェクション法で導入した。

4. AML1/Evi-1 のトランスフォーミング活性に寄与する機能領域

t(3;21) 転座によって生成される融合蛋白質の一部分である AML1 領域には Runt-domain と呼ばれる部分が存在し、この領域はマウスの転写因子である PEBP2/CBF の α サブユニットと高い相同性を有するとともに、DNA あるいは他の蛋白質と結合する能力を持つと考えられている (39, 40, 41)。実際に PEBP2 は DNA 上の PEA2/PEBP2 部位と呼ばれる、ポリオマウィルスのエンハンサー領域に結合することが知られている (42)。PEBP2/CBF のサブタイプである PEBP2 α B/CBF α はヒトにおける AML1 に相当するものと考えられており、この PEBP2 α B/CBF α は、その Runt-domain の下流に転写活性化領域を有することが最近明らかにされた (43)。AML1/Evi-1 融合蛋白質に含まれる AML1 は転座によって Runt-domain の直後で切断されており、DNA 結合領域は残しているがその下流の転写活性化領域を失っている (14)。したがって AML1/Evi-1 融合蛋白質によって正常の AML1 蛋白質の機能が阻害される可能性があり、このことが白血病の発症に関与しうることが考えられる。

一方、Evi-1 遺伝子は、N 端に7つの zinc finger 構造 (第1 zinc finger 領域)、C 端寄りに3つの zinc finger 構造 (第2 zinc finger 領域) を持ち、第2 zinc finger 領域のさらに C 端寄りには acidic domain を持

つ。最近になって、*Evi-1* は NIH 3T3 細胞や P19 細胞に発現させることによって、第 2 zinc finger 領域に依存する形で AP1 活性を上昇させることが示された(29)。細胞のトランスフォーメーションに伴って AP1 活性の上昇を認める場合があることはよく知られている。*AML1/Evi-1* 融合遺伝子は *Evi-1* の全長を含んでおり、以上の事実から *AML1/Evi-1* のトランスフォーミング活性の少なくとも一部が *Evi-1* 部分に担われている可能性が考えられる。

AML1/Evi-1 に含まれるこれらの機能ドメインが、実際に線維芽細胞に対するトランスフォーミング活性に関与するかを決定するために、筆者は *AML1/Evi-1* 遺伝子について、図 6 に示すような一連の部位特異的な欠失変異体を pSR α MSVtkneo 上に構築した。*AML1/Evi-1ARD* は *AML1* 部分の Runt-domain を欠くもの、*AML1/Evi-1AZ8-10* は *Evi-1* 部分の第 2 zinc finger 領域を欠くもの、*AML1/Evi-1AC-end* は *Evi-1* 部分の acidic domain を欠くもの、*AML1/Evi-1AZ8-10+AD* は *Evi-1* 部分の第 2 zinc finger 領域と acidic domain を欠くものである。まず各々の変異体を COS7 細胞で発現させ、抗 *AML1*、または抗 *Evi-1* 抗体を用いたウェスタンブロット法を行った。個々の変異体は予想される分子量で十分に発現されていることが確認された(図 7)。Rat-1 細胞に変異体のレト

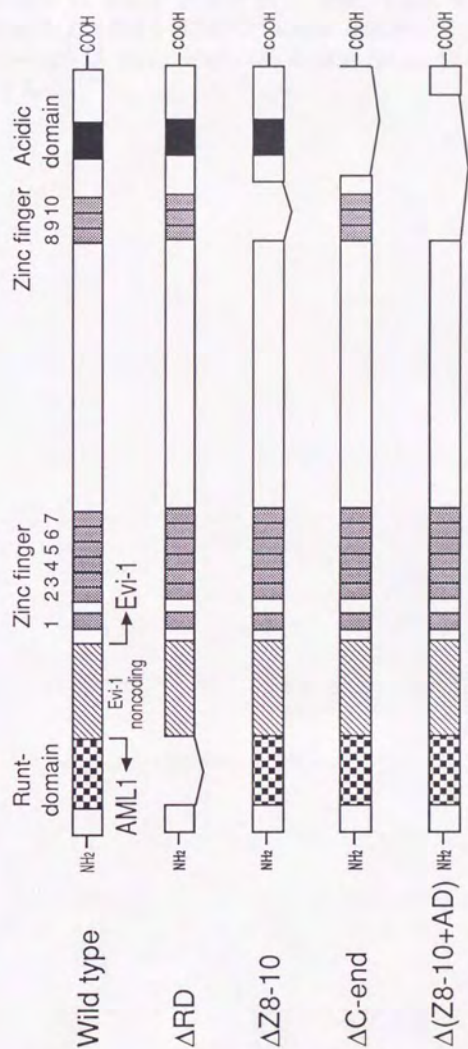


図6 AML1/Evi-1 欠失変異体の構造

図6 AML1/Evi-1 欠失変異体の構造

AML1/Evi-1 Δ RD は AML1 部分の Runt-domain を欠くもの、AML1/Evi-1 Δ Z8-10 は Evi-1 部分の第2 zinc finger 領域を欠くもの、AML1/Evi-1 Δ C-end は Evi-1 部分の acidic domain を欠くもの、AML1/Evi-1 Δ (Z8-10+AD) は Evi-1 部分の第2 zinc finger 領域と acidic domain を欠くものである。

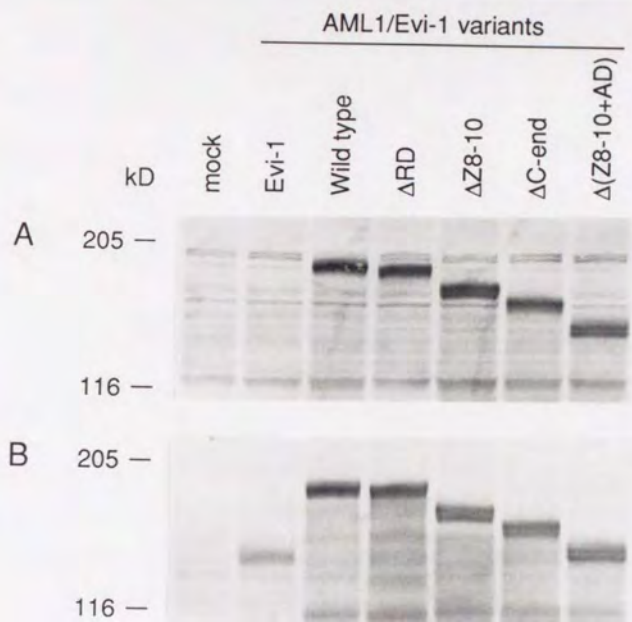


図7 AML1/Evi-1 の欠失変異体の COS7 細胞での発現

レトロウイルスベクター上に構築した AML1/Evi-1 の欠失変異体をヘルパーウイルスとともに COS7 細胞に導入した。導入された COS7 の細胞溶解液を抗 AML1 抗体 (A) あるいは抗 Evi-1 抗体 (B) を用いてウェスタンブロット法で解析した。最も左のレーンは親株の Rat-1 細胞を示す。Evi-1 蛋白質は抗 Evi-1 抗体によるブロットのみで検出できるが、他の AML1/Evi-1 の欠失変異体はどちらの抗体でも検出されている。

ロウィルスを感染させ、G418 による選択後、G418 抵抗性の細胞集団に対して軟寒天培地アッセイを行った。図8に示したように、*Evi-1* 部分の第2 zinc finger 領域を欠失した *AML1/Evi-1ΔZ8-10* は、線維芽細胞をトランスフォームさせる能力を喪失した。第2 zincfinger領域と acidic domain の両者を欠く *AML1/Evi-1Δ(Z8-10+AD)* も同様に軟寒天培地で肉眼的コロニーを形成しなかった。それに対して、*AML1*部分の Runt-domain を欠失した *AML1/Evi-1ΔRD* と野生型の *Evi-1* は、完全型の *AML1/Evi-1* に比してやや低いものの、肉眼的コロニーの形成を示した。また *AML1/Evi-1ΔC-end* における acidic domain の欠失はトランスフォーミング活性に影響を与えなかった。ノーザンプロット法ではそれぞれの融合遺伝子の mRNA は、*AML1/Evi-1ΔZ8-10* または *AML1/Evi-1 Δ(Z8-10+AD)* を導入したクローンにおいても、*AML1/Evi-1* の導入によってトランスフォームしたクローンと同等またはそれ以上に存在することが示された(図9)。したがって変異体におけるトランスフォーミング活性の喪失は該当する変異体の産物の発現不足や不安定性によるものでなく、生物活性の変化によるものであるとすることができる。これらの結果は、*AML1/Evi-1* 融合蛋白質による線維芽細胞のトランスフォーメーションには、Runt-domain や acidic domain よりもむしろ *Evi-1* 部分の第2 zinc

レトロウィルス

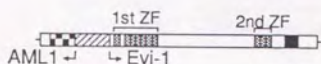
AML1/Evi-1 変異体

コロニー数
実験1 実験2

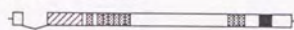
tkneo

0 0

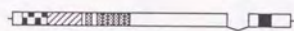
AML1/Evi-1



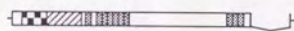
103 90

AML1/Evi-1 Δ RD

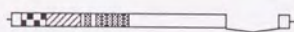
40 35

AML1/Evi-1 Δ Z8-10

0 0

AML1/Evi-1 Δ AD

153 103

AML1/Evi-1 Δ (Z8-10+AD)

0 3

Evi-1



50 45

図8 AML1/Evi-1 欠失変異体の造腫瘍性の比較

AML1/Evi-1の変異体を模式的に示した。それぞれの欠失変異体を導入したRat-1の細胞集団をG418による選択の後、5%ウシ胎児血清を含む軟寒天培地にプレート当たり 2×10^4 個の密度で播種した。コロニー数は14から20日後に算定し、 1×10^5 個当たりの値に標準化した。それぞれの値は独立した3枚のプレートの平均値を示す。

図9 Rat-1 細胞に導入された *AML1/Evi-1* の欠失変異体の mRNA の発現 (説明次ページ)

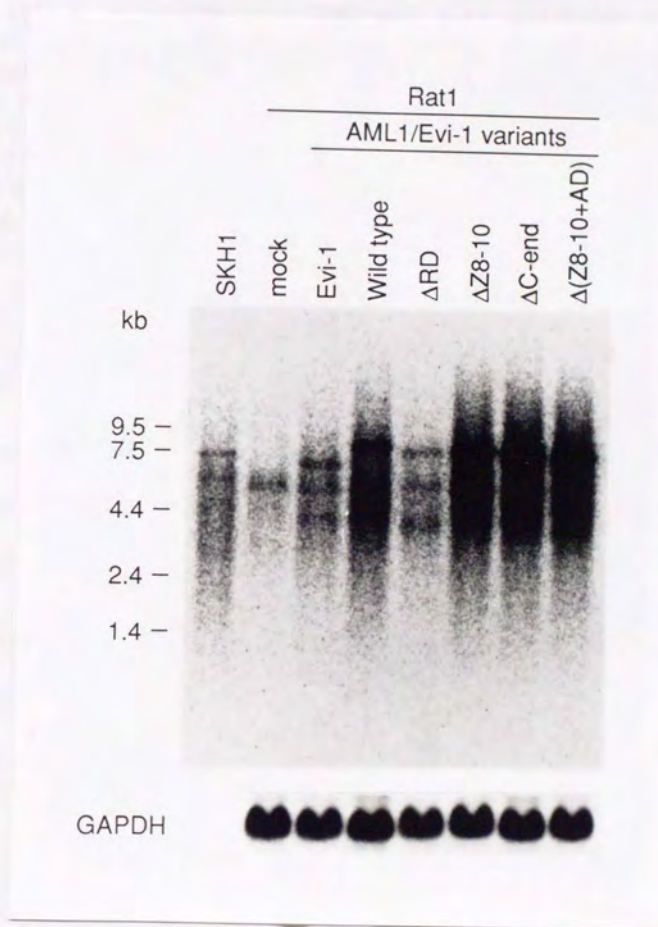


図9 Rat-1 細胞に導入された *AML1/Evi-1* の欠失変異体の mRNA の発現

AML1/Evi-1 の欠失変異体を導入した Rat-1 細胞から調整した mRNA を 0.8% の formaldehyde-ararose gel によるノーザンブロット法で解析した。(上図) ヒト *Evi-1* cDNA による hybridization ではそれぞれの *AML1/Evi-1* の欠失変異体の転写産物が期待される位置に検出される。導入された変異体はトランスフォームした細胞でもトランスフォームしない細胞でも十分発現していることが示されている。最も左のレーンは SKH1 細胞のもので、*AML1/Evi-1* 融合遺伝子に由来する 8.2 kb と 7.0 kb の 2 つの主要な転写産物が見られる。(下図) 同一のフィルターに対してラットの *GAPDH* プローブを用いて hybridization を行った。SKH1 細胞のレーンを除く各レーンともほぼ同量の RNA がプロットされていることが示されている。

finger 領域が重要であることを示している。

5. *AML1/Evi-1* 発現細胞における内因性 c-Jun 蛋白質の発現レベルの上昇

最近になって P19 細胞に *Evi-1* を導入すると、AP1 活性の上昇とともに内因性の c-Jun 蛋白質の発現レベルが上昇することが報告されている (29)。また *c-jun* は単独であるいは他の癌遺伝子と協同してある種の細胞株をトランスフォームさせることが知られている (44-47)。筆者は *AML1/Evi-1* によってトランスフォームした細胞内で *c-jun* の発現レベルの変化が認められるかどうかを調べた。まず *Evi-1* を安定に発現する Rat-1 細胞においては、NIH 3T3 細胞や P19 細胞の場合と同様にノーザンブロット法において *c-jun* の発現の明らかな上昇が認められた (図10)。さらに *AML1/Evi-1* によってトランスフォームした Rat-1 細胞においても独立した複数のクローンにて *c-jun* の発現の上昇が認められた (図10)。これらの結果は *AML1/Evi-1* は Rat-1 細胞においても内因性の c-Jun 蛋白質の発現を活性化することを示唆するものである。

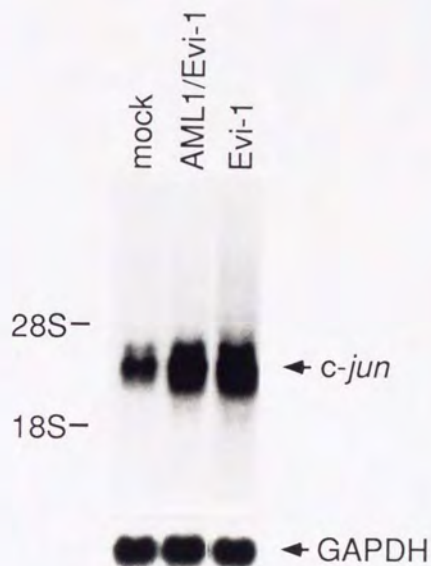


図10 AML1/Evi-1 または Evi-1 によってトランスフォームした Rat-1 細胞における *c-jun* の発現

AML1/Evi-1 または Evi-1 によってトランスフォームした Rat-1 細胞を 5% ウシ胎児血清を含む DMEM で培養し、80% の confluency で採取した。それらの細胞から総 RNA を抽出し、1% formaldehyde-ararose gel によるノーザンブロット法で解析を行った。最も左のレーンは親株の Rat-1 細胞由来の RNA を示す。フィルターはラットの *c-jun* cDNA を用いて hybridization を行った（上図）。同一のフィルターに対してラットの GAPDH プローブを用いて再び hybridization を行った（下図）。

IV 考察

表3に示すように染色体転座による転写因子の異所性発現や構造変化は、ヒトの白血病発症においてしばしば認められる重要な分子機構となっている(48)。例を挙げると、pre-B細胞型の急性リンパ球性白血病にみられるt(1;19)転座では、免疫グロブリンの κ 鎖のエンハンサー結合遺伝子であるE2Aの転写活性化ドメインと、PBX1のホメオボックスドメインが融合する(49,50)。同様に急性前骨髄性白血病にみられるt(15;17)転座では、レチノイン酸の α 受容体遺伝子(RAR α)が、核内器官の構成要素であるPMLと融合し、このPMLも転写因子の一種と考えられている(51-53)。さらに、急性骨髄性白血病におけるt(8;21)転座がAML1/MTG8、急性骨髄性または急性骨髄単球性白血病におけるt(6;9)転座がDEK/CAN、好酸球増多を伴う急性骨髄単球性白血病におけるinv(16)がCBF β /MYH11というキメラ型の転写因子遺伝子をそれぞれ形成することはよく知られている(15, 54-57)。しかしながら、これらの融合産物のうち線維芽細胞に対してトランスフォーミング活性を持つことが実際に示されているのはE2A/PBX1のみである(58)。今回の研究で、AML1/Evi-1とEvi-1は少なくともRat-1細胞で評価する限りトランスフォーミング遺伝子として振る舞うことが示された。本実験の系はこれら

表3 ヒト白血病, 悪性リンパ腫における染色体異常に伴う転写因子の異常発現

疾患	染色体異常	転写因子	エンハンサーの由来*
AML(M1, M7)	t(3;3)(q21;q26)	EVI-1	?
	inv(3)(q21q26)	EVI-1	?
ALL(L3), BL**	t(8;14)(q24;q32)	MYC	IgH locus
	t(2;8)(p12;q24)	MYC	Igκ locus
	t(8;22)(q24;q11)	MYC	Igλ locus
	t(3;14)(q27;q32)	BCL6(BCL5)	IgH locus
DLCL***	t(3;22)(q27;q11)	BCL6(BCL5)	Igλ locus
	t(8;14)(q24;q11)	MYC	TCRα/δ locus
ALL(T cell)	t(1;14)(p32;q11)	TAL-1(SCL, TCL5)	TCRα/δ locus
	t(7;9)(q35;q34)	TAL-2	TCRβ/γ locus
	t(7;19)(q35;p13)	LYL-1	TCRβ/γ locus
	t(11;14)(p15;q11)	TTG-1(Rhombotin1)	TCRα/δ locus
	t(11;14)(p13;q11)	TTG-2(Rhombotin2)	TCRα/δ locus
	t(7;11)(q35;p13)	TTG-2(Rhombotin2)	TCRβ/γ locus
	t(10;14)(q24;q11)	HOX11(TCL3)	TCRα/δ locus
	t(7;10)(q35;q24)	HOX11(TCL3)	TCRβ/γ locus

*染色体異常の結果, 転写因子遺伝子の近傍にきて, 異常発現の原因となるエンハンサーの由来を示す。

**Burkitt's Lymphoma

***Diffuse Large Cell Lymphoma

の遺伝子の発癌活性を測定するのに適していると言うことができる。また *AML1/Evi-1* が *BCR/ABL* 遺伝子によってトランスフォームした Rat-1 細胞に対しても付加的な造腫瘍性を示すことは、本遺伝子が CML の急性転化において重要な役割を果たしうることを示唆するものである (14)。

キメラ型の転写因子が白血病を引き起こすメカニズムは現在までに知られているものだけでも様々である。*PML/RAR α* は *PML* が関連する正常な核内蛋白に対して dominant negative な作用を及ぼすことによって白血病発症につながると考えられている (53, 59-61)。*E2A/PBX1* の場合は、*E2A* の N 端側の領域が *PBX1* に融合することによって、通常では不活性型の DNA 結合蛋白質である *PBX1* の転写活性を高め、トランスフォーメーションに導くと考えられている (58, 62)。同様な機構が非造血器腫瘍の Ewing 肉腫で形成される *EWS/FLI1* 融合蛋白質においても存在することが示唆されている (63-65)。今回の研究では、*Evi-1* 遺伝子は *AML1/Evi-1* 遺伝子と同等のトランスフォーミング活性を持つことが示された。さらに *AML1/Evi-1* の欠失変異体を用いた実験では、*AML1* 領域の Runt-domain よりむしろ *Evi-1* 領域の第 2 zinc finger 領域がトランスフォーミング活性に寄与することが明らかになった。*Evi-1* が主として自身の第 2 zinc finger 領域に依存する形で AP1 を活性化するという

報告もなされており(Tanaka,submitted)、今回の結果と併せて AML1/ Evi-1 の生物活性にとってその Evi-1 部分の第2 zinc finger 領域が重要な役割を果たすことが強く示唆される。また Evi-1 が正常の血液細胞ではほとんど発現していないことと照らし合わせると(24)、AML1/Evi-1 の造腫瘍効果の少なくとも一部は、本来 Evi-1 の発現が無いからあるいはきわめて低い細胞において異所性に Evi-1 と同等の蛋白質を発現させることによることが考えられる。このことは AML1/Evi-1 蛋白質が SKH1 細胞や t(3;21) 転座を持つ他の細胞において、異所性の転写因子として機能しているというモデルに合致するものである。

t(3;21) 転座は *de novo* の白血病にはきわめて稀で、その出現は主に CML の急性転化に限られているために、造腫瘍性に関する協調作用という観点から、BCR/ABL と AML1/Evi-1 の特定の相互作用の存在を調べる必要がある。ある種の転写因子の活性は、細胞質に存在する蛋白質からリン酸化を受けることによって調節されていることはよく知られた事実である(66, 67)。筆者は AML1/Evi-1 が BCR/ABL によって同様の調節を受ける可能性があるかどうかを調べた。BCR/ABL と AML1/Evi-1 の両者を発現する Rat-1 細胞株の細胞溶解液を用いて抗 Evi-1 抗体による免疫沈降を行った後、SDS-PAGE にて展開し、抗リン酸化チロシン抗体

を用いてウェスタンブロットを行ったが、AML1/Evi-1 の有意なリン酸化は認めなかった(データ不掲載)。AML1/Evi-1 と共発現することによって BCR/ABL のチロシンキナーゼ活性が受ける影響を調べるために、同じく BCR/ABL と AML1/Evi-1 の両者を発現する Rat-1 細胞株を用いて抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタンブロットを行ったが、BCR/ABL 単独を発現する Rat-1 細胞株に比べて有意なリン酸化蛋白質の出現や増加は認めなかった(データ不掲載)。Rat-1 細胞の軟寒天培地アッセイで見える限り、AML1/Evi-1 の造腫瘍性はむしろ BCR/ABL を上回るレベルであることが判明しており、これらの結果から AML1/Evi-1 は一度細胞内で生成されれば、BCR/ABL と協調してというよりむしろ単独で発癌を導くことが示唆される。

c-Jun は本来は AP1 複合体の主要な構成物質として同定された核内の DNA 結合蛋白質である (26, 27)。c-jun 遺伝子は TPA などの化学物質や種々の増殖因子などの外来刺激によって誘導され、v-sis/PDGF2, v-mos, BCR/ABL などのトランスフォーミング活性を持った癌遺伝子を導入することによってもその発現の上昇が見られる (68-70)。AP1 活性は、活性型 Ha-ras などの導入によって細胞がトランスフォーメーションを起こすことに伴って増強することが知られている (71, 72)。筆者は今回の実

験で、*AML1/Evi-1* または *Evi-1* を発現する Rat-1 細胞にて *c-jun* の発現が上昇していることを見出した。*c-Jun* の発現は AP1 によって促されることが知られているが (73, 74)、一過性の遺伝子導入実験の系において、*AML1/Evi-1* は AP1 を活性化する作用を持つことが示唆されている (Tanaka, submitted)。Evi-1 もまた、NIH 3T3 細胞に導入することによって *c-Jun* の発現と AP1 活性を増強することが報告されている (29)。これらのデータは、*c-Jun* の発現に *AML1/Evi-1* が影響を及ぼし、特に Evi-1 に相当する部分が *c-Jun* の発現上昇に関与する可能性があることを示唆するものである。最近になって Evi-1 は *c-fos* の発現を上げることによって AP1 活性を増強し、その結果 *c-jun* の発現レベルの上昇に至るといふモデルが提唱されており (29)、同様のメカニズムが *AML1/Evi-1* の場合にも作用する可能性がある。したがって *AML1/Evi-1* は *c-Jun* の発現を変化させることによって正常な細胞の増殖あるいは分化を乱すことが推測される。しかしながら *AML1/Evi-1* が直接プロモータ領域に作用して *c-jun* を活性化するのか、それとも他の因子を介して間接的に作用するのかは現在のところ不明である。最近の研究では Evi-1 の結合部位に存在する DNA の認識配列が明らかにされており、今後の研究によって *AML1/Evi-1* が *c-Jun* の発現に影響を及ぼすメカニズムについて有用な知

見が得られるものと考えられる (75-77)。myc 癌遺伝子は種々の実験において、BCR/ABL などの癌遺伝子と協調的に相互作用することが示されている (37, 78-80)。筆者は Rat-1/AE 細胞における c-myc の発現レベルを親株の Rat-1 細胞と比較したが、有意な変化は認めなかった (データ不掲載)。

t(3;21) 転座の発癌作用のすべてが、AML1 遺伝子のプロモータによって Evi-1 に相当する蛋白質が異所性に発現するというメカニズムによって説明されるのであろうか。今回の研究では Runt-domain を欠く AML1/Evi-1 の変異体 (AML1/Evi-1 Δ RD) や Evi-1 そのものによってもトランスフォーメーションが起こりうることを示された。また筆者は同様の実験系で図2に示した AML1 遺伝子のトランスフォーミング活性の評価も行ったが、AML1 遺伝子単独では Rat-1 細胞に導入しても肉眼的コロニーの形成はなく、トランスフォーミング活性は認めないことが判明している (データ不掲載)。AML1 が骨髓球性の白血病細胞や正常な骨髓細胞で発現しており (54)、急性白血病で高頻度に見られる t(8;21) 転座にも関与していることを考慮すると、その機能の変化が造血細胞の分化の攪乱や白血病発症に重要な役割を果たす可能性は大きいと推測される。最近マウスにおいて AML1 に相当する遺伝子が myeloperoxidase や

neutrophil elastase などの骨髄系細胞に特異的な遺伝子を制御していることが明らかにされた(81)。今後の研究によって、t(3;21)転座において *AML1* が果たす真の役割が解明されることが期待される。

V 謝辞

本研究の遂行に当たりましてご指導とご鞭撻を下さいました東京大学医学部第三内科矢崎義雄教授に深謝致します。

本研究の共同研究者、かつ助言者でもある東京大学医学部第三内科平井久丸講師、UCLA 細菌学講座の Owen N. WITTE 氏に深謝致します。

本研究の共同研究者である東京大学医学部第三内科三谷絹子氏、田中智之氏、小川誠司氏に深謝致します。

ラットの *c-jun* cDNA をいただきました ロッシェ分子生物学研究所の T. Curran 氏に深謝致します。

東京大学第三内科の皆様に深謝致します。

VII 文献

1. Martin P, Najfeld V, Fialkow P: B-lymphoid involvement in chronic myelogenous leukemia: implications for the pathogenesis of the disease. *Cancer Genet Cytogenet* 6:359, 1982
2. Fialkow P, Martin P, Najfeld V, Penfold G, Jacobson R, Hansen J: Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 58:158, 1981
3. Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpatz M: Chronic myelogenous leukemia: a consice update. *Blood* 82:691, 1993
4. Rowley JD: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243:290, 1973
5. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G: Localization of *c-abl* oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelogenous leukemia. *Nature* 306:239, 1983

6. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON: An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37:1035, 1984
7. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D: Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210^{bcr/abl} gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247:824, 1990
8. Champlin RE, Golde DW: Chronic myelogenous leukemia: recent advances. *Blood* 65:1039, 1985
9. Coyle T, Najfeld V: Translocation (3;21) in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia prior to the onset of blastic crisis. *Am J Hematol* 27:56, 1988
10. Rubin CM, Larson RA, Bitter MA, Carrino JJ, Le Beau MM, Diaz MO, Rowley JD: Association of a chromosomal 3;21 translocation with the blastic phase of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 70:1338, 1987
11. Schneider NR, Bowman WP, Frenkel EP: Translocation (3;21)(q26;q22) in secondary leukemia. Report of two cases and literature review. *Ann Genet* 34:256, 1991

12. Rubin CM, Larson RA, Anastasi J, Winter JN, Thangavelu M, Vardiman JW, Rowley JD, Le Beau MM: t(3;21)(q26;q21): a recurring chromosomal abnormality in therapy-related myelodysplastic syndrome and an acute myeloid leukemia. *Blood* 76:2594, 1990
13. Chen Z, Morgan R, Baer MR, Ligorsky R, Sandberg AA: Translocation (3;21) characterizes crises in myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 57:153, 1991
14. Mitani K, Ogawa S, Tanaka T, Miyoshi H, Kurokawa M, Mano H, Yazaki Y, Ohki M, Hirai H: Generation of *AML1-Evi-1* fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia. *EMBO J* 13:504, 1994
15. Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M: 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, 1991
16. Kania MA, Bonner AS, Duffy JB, Gergen JB: The *Drosophila* segmentation gene *runt* encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. *Genes Dev* 4:1701, 1990

17. Kagoshima H, Shigesada K, Satake M, Ito Y, Miyoshi M, Ohki M, Pepling M, Gergen P: The Runt-domain identifies a new family of heterodimeric transcriptional factor. *Trends Genet* 9:338, 1993
18. Mucenski ML, Taylor BA, Ihle JN, Hartley JW, Morse H3, Jenkins NA, Copeland NG: Identification of a common ecotropic viral integration site, *Evi-1*, in the DNA of AKXD murine myeloid tumors. *Mol Cell Biol* 8:301, 1988
19. Matsugi T, Morishita K, Ihle JN: Identification, nuclear localization, and DNA-binding activity of the zinc finger protein encoded by the *Evi-1* myeloid transforming gene. *Mol Cell Biol* 10:1259, 1990
20. Morishita K, Parker DS, Mucenski ML, Jenkins NA, Copeland NG, Ihle JN: Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell* 54:831, 1988
21. Morishita K, Parganas E, Douglass EC, Ihle JN: Unique expression of the human *Evi-1* gene in an endometrial carcinoma cell line: sequence of cDNAs and structure of alternatively spliced transcripts. *Oncogene* 5:963, 1990

22. Bartholomew C, Morishita K, Askew D, Buchberg A, Jenkins NA, Copeland NG, Ihle JN: Retroviral insertions in the CB-1/Fim-3 common site of integration activate expression of the *Evi-1* gene. *Oncogene* 4:529, 1989
23. Bartholomew C, Ihle JN: Retroviral insertions 90 kilobases proximal to the *Evi-1* myeloid transforming gene activate transcription from the normal promoter. *Mol Cell Biol* 11:1820, 1991
24. Morishita K, Parganas E, Parham DM, Matsugi T, Ihle JN: The *Evi-1* zinc finger myeloid transforming gene is normally expressed in the kidney and in developing oocytes. *Oncogene* 5:1419, 1990
25. Morishita K, Parganas E, William CL, Whittaker MH, Drabkin H, Oval J, Taetle R, Valentine MB, Ihle JN: Activation of *EVII* gene expression in human acute myelogenous leukemias by translocations spanning 300-400 kilobases on chromosome band 3q26. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3937, 1992
26. Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK, Tjian R: Human proto-oncogene *c-jun* encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* 238:1386, 1987

27. Angel P, Allegretto EA, Okino ST, Hattori K, Boyle WJ, Hunter T, Karin M: Oncogene *jun* encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* 332:166, 1988
28. Muller AJ, Young JC, Pendergast AM, Pondel M, Landau NR, Littman DR, Witte ON: *BCR* first exon sequences specifically activate the *BCR/ABL* tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol* 11:1785, 1991
29. Tanaka T, Nishida J, Mitani K, Ogawa S, Yazaki Y, Hirai H: Evi-1 raises AP-1 activity and stimulates *c-fos* promoter transactivation with dependence on the second zinc finger domain. (*J Biol Chem*, in press)
30. Izumi M, Miyazawa H, Kamakura T, Yamaguchi I, Endo T, Hanaoka F: Blasticidin S-resistance gene (*bsr*): a novel selectable marker for mammalian cells. *Exp Cell Res* 197:229, 1991
31. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. NY, Cold spring Harbor Laboratory Press, pp 16, 1989

32. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156, 1987
33. Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6, 1983
34. Fort P, Marty L, Piechaczyk M, el Sabroudy S, Dani C, Jeanteur P, Blanchard JM: Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res* 13:1431, 1985
35. Tso JY, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R: Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 13:2485, 1985
36. Schiff-Maker L, Burns MC, Konopka JB, Clark S, Witte ON, Rosenberg N: Monoclonal antibodies specific for *v-abl*- and *c-abl*-encoded molecules. *J Virol* 57:1182, 1986

37. Lugo TG, Witte ON: The *BCR-ABL* oncogene transforms Rat-1 cells and cooperates with *v-myc*. *Mol Cell Biol* 9:1263, 1989
38. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K: Current protocols in molecular biology. New York, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, pp 9, 1992
39. Daga A, Tighe JE, Calabi F: Leukemia/*Drosophila* homology. *Nature* 356:484, 1992
40. Erickson P, Gao J, Chang KS, Look T, Whisenant E, Raimondi S, Lasher R, Trujillo J, Rowley J, Drabkin H: Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, *AML1/ETO*, with similarity to *Drosophila* segmentation gene, *runt*. *Blood* 80:1825, 1992
41. Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y: PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human *AML1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6859, 1993

42. Piette J, Yaniv M: Two different factors bind to the α -domain of the polyoma virus enhancer, one of which also interacts with the SV40 and *c-fos* enhancers. *EMBO J* 6:1331, 1987
43. Bae SC, Ogawa E, Maruyama M, Oka H, Satake M, Shigesada K, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Ito Y: PEBP2 α B/mouse AML1 consists of multiple isoforms that possess differential transactivation potentials. *Mol Cell Biol* 14:3242, 1994
44. Castellazzi M, Dangy JP, Mechta F, Hirai SI, Yaniv M, Samaraf S, Lassailly A, Brun G: Overexpression of avian or mouse *c-jun* in primary chick embryo fibroblasts confers a partially transformed phenotype. *Oncogene* 5:1541, 1990
45. Schutte J, Minna J, Birrer M: Deregulated expression of human *c-jun* transforms primary rat embryo cells in cooperation with an activated *c-Ha-ras* gene and transforms Rat-1a as a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2257, 1989
46. Schutte J, Viallet J, Segal S, Fedorko J, Minna J: *jun-B* inhibits and *c-fos* stimulates the transforming and trans-activating activities of *c-jun*. *Cell* 59:987, 1989

47. Suzuki T, Hashimoto Y, Okuno H, Sato H, Nishina H, Iba H: High level expression of human *c-jun* gene causes cellular transformation of chicken embryo fibroblasts. *Jpn J Cancer Res* 82:58, 1991
48. Nichols J, Nimer SD: Transcriptional factors, translocations, and leukemia. *Blood* 80:2953, 1992
49. Nourse J, Mellentin JD, Galili N, Wilkinson J, Stanbridge E, Smith SD, Cleary ML: Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* 60:535, 1990
50. Kamps MP, Murre C, Sun XH, Baltimore D: A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* 60:547, 1990
51. Borrow J, Goddard AD, Sheer D, Solomon E: Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science* 249:1577, 1990

52. de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A: The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347:558, 1990
53. Dyck JA, Maul GG, Miller WH Jr., Don Chen J, Kakizuka A, Evans RM: A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 76:333, 1994
54. Miyoshi H, Kozu T, Shimizu K, Enomoto K, Maseki N, Kaneko Y, Kamada N, Ohki M: The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an *AML1-MTG8* fusion transcript. *EMBO J* 12:2715, 1993
55. Nucifora G, Birn DJ, Erickson P, Gao J, LeBeau MM, Drabkin HA, Rowley JD: Detection of DNA rearrangements in the *AML1* and *ETO* loci and of an *AML1/ETO* fusion mRNA in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia. *Blood* 81:883, 1993

56. von Lindern M, Fornerod M, van Baal S, Jaegle M, de Wit T, Buijs A, Grosveld G: The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, *dek* and *can*, and the expression of a chimeric, leukemia-specific *dek-can* mRNA. *Mol Cell Biol* 12:1687, 1992
57. Liu P, Tarle SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS: Fusion between transcriptional factor CBF β and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 261:1041, 1993
58. Kamps MP, Look AT, Baltimore D: The human t(1;19) translocation in pre-B ALL produces multiple nuclear E2A-Pbx1 fusion proteins with differing transforming potentials. *Genes Dev* 5:358, 1991
59. Kakizuka A, Miller WJ, Umesono K, Warrell RJ, Frankel SR, Murty VV, Dmitrovsky E, Evans RM: Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR α with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66:663, 1991

60. de Thé H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A: The PML-RAR α fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66:675, 1991
61. Kastner P, Perez A, Lutz Y, Rochette EC, Gaub MP, Durand B, Lanotte M, Berger R, Chambon P: Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor α fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *EMBO J* 11:629, 1992
62. Van Dijk MA, Voorhoeve PM, Murre C: Pbx1 is converted into a transcriptional activator upon acquiring the N-terminal region of E2A in pre-B-cell acute lymphoblastoid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6061, 1993
63. May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O, Zucman J, Thomas G, Denny CT: Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by *FLI1* for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5752, 1993

64. May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R, Denny CT: The Ewing's sarcoma *EWS/FLI-1* fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than *FLI-1*. *Mol Cell Biol* 13:7393, 1993
65. Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, Cormier F, Delattre O, Roussel M, Thomas G, Ghysdael J: DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing's sarcoma. *Mol Cell Biol* 14:3230, 1994
66. Luscher B, Kuenzel EA, Krebs EG, Eisenman RN: Myc oncoproteins are phosphorylated by casein kinase II. *EMBO J* 8:1111, 1989
67. Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR: Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353:670, 1991
68. Sonobe MH, Bravo R, Armelin MS: Imbalanced expression of cellular nuclear oncogenes caused by v-*sis*/PDGF-2. *Oncogene* 6:1531, 1991
69. Mandanas RA, Boswell HS, Lu L, Leibowitz D: *BCR/ABL* confers growth factor independence upon a murine myeloid cell line. *Leukemia* 6:796, 1992

70. Jehn B, Costello E, Marti A, Keon N, Deane R, Li F, Friis RR, Burri PH, Martin F, Jaggi R: Overexpression of Mos, Ras, Src, and Fos inhibits mouse mammary epithelial cell differentiation. *Mol Cell Biol* 12:3890, 1992
71. Wasylyk C, Imler JL, Wasylyk B: Transforming but not immortalizing oncogenes activate the transcription factor PEA1. *EMBO J* 7:2475, 1988
72. Schonthal A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ, Ponta H: Requirement for *fos* gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* 54:325, 1988
73. Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M: The *jun* proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55:875, 1988
74. Angel P, Karin M: The role of Jun, Fos, and AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129, 1991
75. Perkins AS, Fishel R, Jenkins NA, Copeland NG: *Evi-1*, a murine zinc finger proto-oncogene, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* 11:2665, 1991

76. Delwel R, Funabiki T, Kreider BL, Morishita K, Ihle JN: Four of the seven zinc fingers of the *Evi-1* myeloid-transforming gene are required for sequence-specific binding to GA(C/T)AAGA(T/C)AAGATAA. *Mol Cell Biol* 13:4291, 1993
77. Funabiki T, Kreider BL, Ihle JN: The carboxyl domain of zinc fingers of the *Evi-1* myeloid transforming gene binds a consensus sequence of GAAGATGAG. *Oncogene* 9:1575, 1994
78. Land H, Parada LF, Weinberg RA: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperative oncogenes. *Nature* 304:596, 1983
79. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM: Human *N-myc* gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature* 316:160, 1985
80. Schwartz RC, Santon LW, Riley SC, Marcu KB, Witte ON: Synergism of *v-myc* and *v-Ha-ras* in the in vitro neoplastic progression of murine lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 6:3221, 1986

81. Nuchparayoon I, Meyers S, Scott LM, Suzow J, Hiebert S, Friedman AD: *PEBP2/CBF*, the murine homolog of the human myeloid proto-oncogenes *AML1* and *PEBP2 β /CBF β* , regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. *Mol Cell Biol* 14:5558, 1994



