

論文の内容の要旨

論文題目 **Mechanisms of Stat5 Activation in Cytokine Receptor Signaling**
和訳 サイトカインレセプターのシグナル伝達における
転写因子 Stat5 活性化機構の解析

指導教官 新井 賢一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 曾 栄

序

サイトカインはリンパ球/血球系において増殖、分化、細胞死などの広範な細胞機能を調節する分泌タンパク質である。これらの細胞機能の誘導には、サイトカインにより活性化される複数のシグナル伝達経路が関与することが知られているが、中でも Jak-Stat 経路は、サイトカインレセプターから核へのシグナル伝達において非常に重要な役割を担っている。この経路では新規のメカニズムによりシグナルを伝達する。Signal transducers and activators of transcription (Stat)として知られる転写因子は細胞質に不活性型として存在しているが、これが Jak ファミリーのチロシンキナーゼ(Jak)によってリン酸化されると二量体化し核へと移行する。核へ移行した Stat は転写因子として機能し標的遺伝子の転写を調節する。近年、いくつかの遺伝病がこの Jak-Stat 経路の異常と関連づけられた。

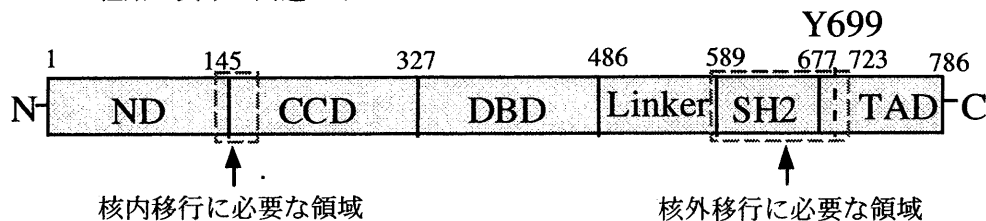


図1 Stat5B の構造

ND: N 末端ドメイン、 CCD: コイルドコイルドメイン、 DBD: DNA 結合ドメイン、
TAD: 転写活性化ドメイン

Stat は Jak とともに極めて重要なシグナル伝達経路を成しており、過去数年の間に多くの情報が蓄積されてきた。しかし未解明の点も数多く残されている。ひとつの重要な問題は、30を超える数のサイトカインが比較的小さなファミリーである Jak や Stat の活性化を通じて、どの

ようにして特異性を出しているのかということである。さらに Stat の活性化におよぼすセリン残基のリン酸化の役割や、核移行のメカニズムなども明らかでは無い。

私は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) (未熟な血球系細胞のみならず成熟したマクロファージや好中球、好酸球に対しても作用することが知られる多能性サイトカイン) による Stat5 の活性化機構を解明する目的で、以下の三つの点に焦点を絞って解析を行った。

1. GM-CSF による Stat5A/Stat5B の活性化機構
2. GM-CSF のシグナル伝達における Stat5B のセリンリン酸化の役割
3. 能動的タンパク質輸送機構に依存した Stat5B の細胞質—核間移行

結果

1. GM-CSF による STAT5A/STAT5B の活性化機構の解析

GM-CSF は Stat ファミリーのうち Stat5A および Stat5B を活性化する。これらはアミノ酸レベルで 95% のホモロジーを有しているが、ノックアウトマウスを用いた解析では、共通の表現型のみならず異なる表現型も認められる。GM-CSF による活性化の程度に両者で差があるかどうかは明らかではない。GM-CSF による Stat5 の活性化には、GM-CSF レセプター β 鎖 (GMR β c) の C 末端欠損変異体を用いた以前の解析により、box1、box2 領域および二つのチロシン残基 (Tyr450/452) を含む細胞内領域膜近傍部のみが必要であることが示されていた。一方、IL-2 やエリスロポエチン、成長ホルモン等の他のサイトカインによる Stat5 の活性化は、これらのレセプターサブユニットの特異的なチロシンリン酸化に依存していることが知られている。そこで GM-CSF による Stat5A/5B の活性化におけるレセプターチロシン残基リン酸化の関与について検討するため、細胞内領域の八つのチロシン残基をすべてフェニルアラニンに置換した GMR β c 変異体 Fall と細胞内領域にチロシン残基一つだけ残した一連の GMR β c 変異体 (Y シリーズ) をマウス IL-3 依存性 pro-B 細胞株 BA/F3 に発現させて解析を行った。その結果、Fall による Stat5A および Stat5B のチロシンリン酸化は、野生型 GMR β c の場合に比べ非常に低レベルであることを見出した。さらに、チロシン残基によって程度は様々だが、いずれのチロシン残基を残した場合も Stat5A および Stat5B のリン酸化および DNA 結合活性が誘導された。GM-CSF による活性化を各々の Stat5 アイソフォームについて区別して調べるため、Stat5A、Stat5B の一方あるいは両方を GM-CSF レセプターの α 鎖及び β 鎖変異体とともに COS7 細胞で発現させ Stat5 の活性化について検討した。Stat5A および Stat5B のリン酸化における β 鎖チロシン残基の関与は、COS7 細胞においても BA/F3 細胞の場合と同様の結果であり、すなわち Stat5 のチロシンリン酸化は Fall では誘導されないが、Y シリーズの β 鎖変異体ではいずれのアイソフォーム (Stat5A あるいは Stat5B) についても誘導された。一方、DNA 結合活性に関しては Stat5B を単独あるいは Stat5A と共発現させた場合、Stat5A を単独の場合に比べ高い活性が観察された。さらに転写活性化能についても Stat5B の方が Stat5A よりも高いことが認められた。これらの結果は、これらのアイソフォームがどちらも同様にチロシンリン酸化を受けるにもかかわらず、GM-CSF によって誘導される活性型の Stat5 が Stat5B ホモダイマーあるいは Stat5A と Stat5B から成るヘテロダイマーであることを示唆している。

2. GM-CSF による STAT5B のセリンリン酸化の解析

多くのサイトカインが Jak-Stat 経路の活性化を通じて様々な作用を細胞に及ぼしている。Stat のチロシン残基は通常 Jak キナーゼによってリン酸化されるが、これは Stat の二量体化、核移

行および標的 DNA への特異的結合に必須である。一方、セリン残基のリン酸化は Stat の活性化や他のシグナルとのクロストークに関与することが報告されている。すでに示したように、BA/F3 細胞には GM-CSF により活性化される二種の Stat5 アイソフォームが発現しているが、SDS-PAGE による解析では Stat5A が一本のバンドであるのに対し Stat5B は二本のバンドとして検出される。GM-CSF で刺激すると Stat5B の移動度のみがさらに変化した。GM-CSF に応答した移動度の変化は Stat5B を COS7 細胞に発現させた場合にも観察され、これはセリンキナーゼ阻害剤である H-7 や PD98059 によって阻害された。また変異導入実験により、GM-CSF 非刺激時にみられる恒常的な移動度の差には Ser730 が重要で、GM-CSF 刺激時にみられる誘導的な移動度の差には Tyr699 が重要であることを明らかにした。さらに、この Ser730 および C 末端側の二つのセリン残基は、Stat5B の転写活性化能および核内での局在と安定性に関与している。以上のように、GM-CSF のシグナル伝達における Stat5B のセリン残基が重要であることを明らかにした。

3. 能動的輸送機構に依存した Stat5B の核—細胞質間移行の解析

Stat はサイトカインや増殖因子に応答してリン酸化され核移行した後、その特異的標的遺伝子の発現を誘導する。活性型 Stat は、後に核内で脱リン酸化されて細胞質へ戻り、これによって活性化—不活性化のサイクルが完了すると考えられている。しかし、Stat の核—細胞質間移行の機構に関してはほとんど明らかにされていない。Stat5B を GFP あるいは FLAG 融合タンパク質として IL-3 依存性の BA/F3 細胞に発現させた場合、増殖状態の細胞中では主に核に局在して

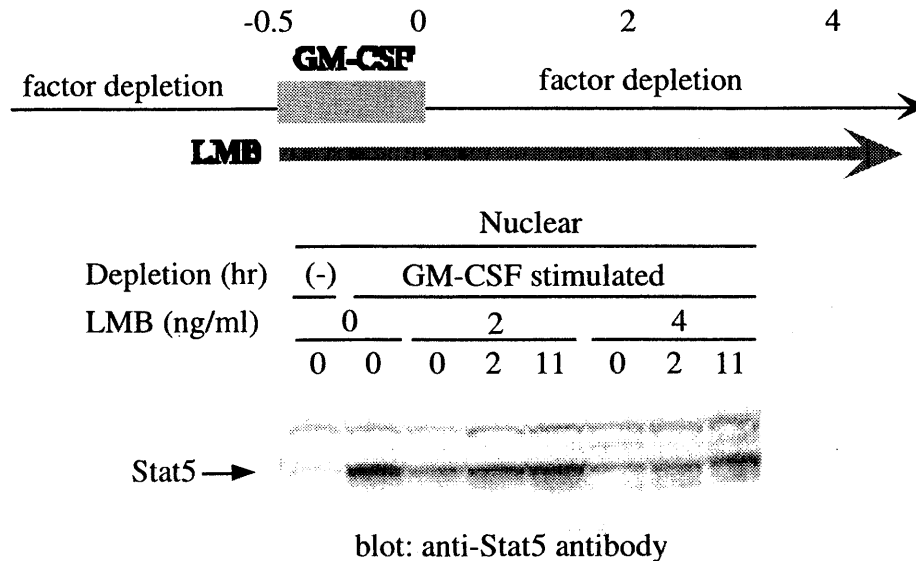


図2 レプトマイシン B による STAT5 の核外輸送の阻害。

Ba/F 細胞の培養液からサイトカインを除き 5 時間置いた後、GM-CSF で 15 分間刺激し、ふたたび GM-CSF をのぞきレプトマイシン B 存在下、非存在下で 2 あるいは 4 時間培養した。細胞と細胞質、核に分画し STAT5 を免疫沈降しウェスタンブロットで解析した。STAT5 は GM-CSF 刺激後すみやかに核に移動しその後、徐々に細胞質に戻るが、レプトマイシンの添加はその過程を阻害した。

いた。この細胞を IL-3 非存在下で培養すると Stat5B の細胞質への局在が観察されたが、IL-3 を添加すると再び核内に検出されるようになった。ここに核外輸送受容体 CRM1 の特異的阻害剤である Leptomycin B (LMB) を添加すると、IL-3 非存在下でも Stat5B の核内への蓄積が観察された。同様の結果は、Stat5B を一過性に発現させた COS7 細胞においても観察された。LMB は Stat5B の活性化には影響せず、また Stat5B の活性化に必須の Tyr699 への変異導入によっても LMB による核内への蓄積は阻害されなかったことから、LMB 添加時にみられた核内への局在化は、恒常的な核内輸送機構に依存するものと考えられた。さらにアミノ末端側のロイシンジッパー様領域および二量体化に必要なドメイン周辺の領域とが、各々 Stat5B の核内および核外への移行に重要であることを明らかにした。以上の結果は、Stat5B は核—細胞質間を循環しており、その局在は核内輸送と核外輸送とのバランスを刺激に応じて調節することで決定されることを示唆している。

結論

1. GM-CSF による Stat5A/Stat5B の活性化には GMRβc のチロシン残基が重要である。
2. Stat5A および Stat5B は GM-CSF 刺激にตอบสนองして同程度のチロシンリン酸化を受けるが、Stat5B の方がより高い DNA 結合活性および転写活性可能を示す。
3. Stat5B は Ser730 が恒常的なリン酸化されており、このリン酸化には H-7 あるいは PD98059 感受性のプロテインキナーゼが関与する。
4. Ser730 および C 末端側の二つのセリン残基は、Stat5B の転写活性化能および核内での局在と安定性に関与している。
5. Stat5B は能動的タンパク質輸送機構に依存して核—細胞質間を刺激非依存的に循環しており、その核内移行には N 末端領域が、また核外移行には二量体化ドメイン周辺の領域が重要である。
6. Stat5B の局在は、核内輸送と核外輸送のバランスの刺激依存的な変化によって調節されている。

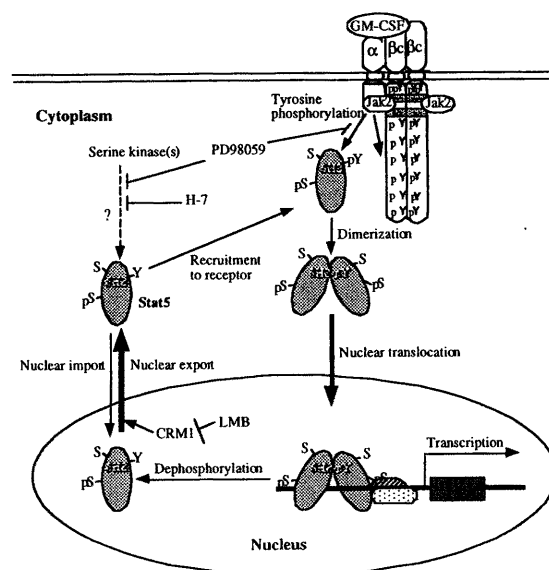


図3 Stat5の活性化のモデル