

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 曾 栄

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。サイトカインレセプターのシグナル伝達においてチロシンキナーゼ Jak と転写因子 Stat は非常に重要な役割を担っている。Jak-Stat 経路は過去数年の間に多くの情報が蓄積されてきたが、未解明の点も数多く残されている。本研究は、マウス IL-3 依存性 pro-B 細胞株 BA/F3 とサルの腎上皮細胞株 COS7 を用いて、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) とインターロイキン 3 (IL-3) による Stat5 の活性化機構を詳細に解析したものであり、以下の結果を得た。

1. GM-CSF による STAT5A/STAT5B の活性化機構の解析

Stat ファミリーは Stat1~Stat6 まで知られているが、GM-CSF はこのうちの Stat5 を活性化する。GM-CSF による Stat5A および Stat5B 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 BA/F3 細胞および COS7 細胞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 のリン酸化が誘導された。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

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

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生理状況によって調節することで決定されることを示唆している。

以上、本研究から得た知見はサイトカインレセプターのシグナル伝達におけるStat5の活性化機構の解明に重要な貢献をもたらすものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。