

## 論文の内容の要旨

論文題目

### **A GTPase activating protein binds STAT3 and is required for IL-6-induced STAT3 activation and differentiation of a leukemic cell line**

GTPase 活性化タンパク質 MgcRacGAP と転写因子 STAT3  
の相互作用とその機能解析

指導教官 北村 俊雄 教授

東京大学大学院 医学系研究科  
平成 12 年 4 月 入学

医学博士課程  
生殖・発達・加齢医学専攻  
氏名 殿塚 行雄

正常細胞は、細胞の増殖と分化の間に一定の秩序が存在すると考えられるが、その秩序に破綻をきたす癌化のメカニズムに関しては、いくつかの有力な分子メカニズムが解明されつつある。マウス白血病細胞株、M1 細胞はサイトカインである IL-6 によりマクロファージへ分化誘導され、最終的にアポトーシスを起こす。この機構において転写因子 STAT3 が分化誘導に関して重要な役割を持つことが知られているが、詳細な分子メカニズムは不明である。

MgcRacGAP は以前、我々の研究室より、M1 細胞を用い、細胞の増殖と分化の調節機構に携わる遺伝子を同定することを目的とした、レトロウイルスによる機能性発現クローニング法により同定されたタンパク質である。これまでの研究により、MgcRacGAP は細胞周期における M 期に中央体に集積し、セリン、スレオニンキナーゼである Aurora B によりリン酸化を受けることにより、低分子量 G タンパク質である Rho A と共同し、その GAP 活性を行使することにより細胞質分裂の終了に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。一方、MgcRacGAP のアンチセンス鎖を M1 細胞へ導入すると、IL-6 に対する

分化誘導に抵抗性が認められるものの、その分子メカニズムは全く不明であった。そこで学位申請者は、さらに詳細に MgcRacGAP と細胞分化との関係を検討した。

MgcRacGAP のセンス鎖を M1 細胞へ導入し、IL-6 の刺激による分化を誘導すると、コントロール群と比べ分化誘導能の亢進が有意に認められた。この表現型において M1 細胞の分化誘導に重要な因子である STAT3 が関与していると仮定し、両者の相互作用を共免疫沈降法により検討したところ、MgcRacGAP、STAT3 が細胞内で相互作用していることを見出した。

この相互作用が直接的あるいは間接的かどうかを Yeast two-hybrid 法により検証したところ、MgcRacGAP は STAT3 と直接的な相互作用をしていることが明らかとなった、さらに他の STAT family についての相互作用を検証した結果 STAT4、5A、5B においても MgcRacGAP は直接的な相互作用が認められた。実際に、MgcRacGAP は Cys domain、GAP domain を介し STAT3 と相互作用し、一方 STAT3 は DNA binding domain を介し MgcRacGAP と相互作用することを pull down 法により明らかにした。両分子の結合は IL-6 の刺激において増強され、免疫染色にて MgcRacGAP-STAT3 複合体は IL-6 刺激下における M1 細胞の核内において特徴的な speckled パターンとして認められた。さらに、EMSA 法により DNA-STAT3 複合体においても MgcRacGAP の存在が認められた。そこで、STAT3 の転写活性化に MgcRacGAP が関与しているのではないかと考え、MgcRacGAP の STAT3 に対しての転写活性の影響をレポーターアッセイ法を用いて検討したところ、MgcRacGAP は有意に STAT3 の転写活性を亢進させた。しかし、MgcRacGAP の GAP domain を不活性化させた、R385A mutant 及び、GAP domain を欠損させた  $\Delta$ -GAP mutant においては、その転写亢進能は認められなかった。また MgcRacGAP のセンス鎖、完全長 cDNA を導入した M1 細胞は IL-6 刺激に対する分化誘導能の亢進が認められる一方、 $\Delta$ -GAP mutant を導入した M1 細胞においては分化誘導能の亢進は認められなかった。さらに、293T 細胞において MgcRacGAP に対する siRNA を用い MgcRacGAP の発現を特異的に抑制すると、STAT3 の転写活性能が著しく減弱された。

以上の結果より本研究において、MgcRacGAP は細胞質分裂において重要な働きをしているだけでなく STAT3 と直接相互作用し、GAP domain を介し STAT3 の転写制御および IL-6 により誘導される M1 細胞の分化において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。