

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 殿塚 行雄

本研究により、白血病細胞である M1 細胞の分化関連遺伝子としてクローニングされ、また細胞質分裂に重要な役割を演ずる低分子量 G タンパク質の調節因子である MgcRacGAP と M1 細胞の IL-6 による分化誘導に重要な役割を担う転写因子 STAT3 との細胞内相互作用が見い出された。そして、MgcRacGAP が細胞質分裂だけでなく細胞分化にも関与し、さらに STAT3 の活性化にその機能を寄与していることが明らかとなり、下記の結果を得ている。

1. レトロウイルスベクターを用いて MgcRacGAP を導入した M1 細胞において、コントロール群と比べ IL-6 に対する分化感受性の亢進が認められた。
2. M1 細胞において MgcRacGAP と IL-6 受容体の下流に存在する転写因子 STAT3 との直接的な相互作用が確認され、その相互作用は IL-6 の刺激により増強された。
3. MgcRacGAP 及び STAT3 の各領域を分断した組み換え型タンパク質を作成し、各々の領域において相互作用しうるか検討したところ、STAT3 は MgcRacGAP の Cystine domain 及び GAP domain を介し結合しており、また MgcRacGAP は STAT3 の DNA binding domain を介し相互作用していることが判明した。
4. MgcRacGAP-STAT3 複合体が細胞内のどの器官で相互作用しているか、免疫染色により検討したところ、IL-6 により刺激された M1 細胞の核内において MgcRacGAP と STAT3 の共局在が認められた。また EMSA により MgcRacGAP は DNA-STAT3 複合体に含まれていることが明らかとなった。
5. MgcRacGAP 及び、GAP domain を欠損させた変異体 (Δ -GAP)、GAP 活性を不活化させた変異体 (R385A)を用い、STAT3 の転写活性に対する reporter assay を行ったところ、MgcRacGAP は STAT3 の転写活性を増強することが示された、一方、 Δ -GAP、及び R385A 変異体においては有意に STAT3 の転写活性を亢進させなかったことから、MgcRacGAP による STAT3 の転写活

性化においては GAP domain の存在が必要であることが明らかとなった。また、 Δ -GAP 変異体を導入した M1 細胞は正常型 MgcRacGAP を導入した細胞に比べ IL-6 による分化誘導の促進効果が認められなかったことより、IL-6 誘導による M1 細胞の分化においても GAP domain の存在が重要であることが明らかとなった。

6. MgcRacGAP のタンパク質を siRNA を用いることにより特異的にノックダウンしたところ、STAT3 の転写活性の低下が認められた。この知見からも、MgcRacGAP が STAT3 の転写活性化機構に貢献していることが判明した、一方 MgcRacGAP をノックダウンした細胞においては IL-6 刺激時における STAT3 のリン酸化状態には変化がないことから、MgcRacGAP は少なくとも、STAT3 が JAK キナーゼによりリン酸化を受けた後の段階において、その機能を発揮しているのではないかと推測された。

以上、本論文は、サイトカインシグナル伝達機構における転写因子 STAT3 と細胞骨格及び細胞分裂関連タンパク質 MgcRacGAP との直接的相互作用を証明し、さらに STAT3 の転写活性化機構に MgcRacGAP の存在が必要であることを示したものである。この事実は上記の 2 つの細胞内シグナル伝達機構のクローストークを示唆する可能性を秘めているばかりでなく、生体内において多くの機能調節を担っている STAT3 の機能解明にも貢献をなす重要な知見であると考えられ、学位の授与に値するものである。