

論文の内容の要旨

論文題目：

サイトカインレセプター common β (β_c) 下流における
転写因子 NF- κ B 活性化機構の解析

氏名：

中村哲也

目的

GM-CSF および IL-3 は造血系幹細胞や種々の血球系細胞などの標的細胞に増殖、分化、抗アポトーシスなど多彩な生物学的応答を誘導するサイトカインである。これらは細胞膜上の特異的レセプターと結合し、両サイトカインレセプターに共通の β サブユニット common β (β_c) のリン酸化および種々のシグナル伝達分子の活性化を誘導する。その結果、核内において多彩な遺伝子群の発現を転写レベルで制御し、種々の細胞応答を精緻に調節する。

転写因子 NF- κ B は、炎症および免疫反応に関与する種々の遺伝子の発現制御因子として知られる。近年、GM-CSF/IL-3 などのサイトカインが NF- κ B の活性化を誘導し、造血組織における細胞増殖や抗アポトーシスに深く関わっていることが報告された。しかしこれまで、 β_c による NF- κ B 活性化の分子機構について詳細は明らかではなかった。本研究では、GM-CSF/IL-3 がそのレセプターと結合後、 β_c 依存性に転写因子 NF- κ B を活性化する分子機構を明らかにすることを目的とした。

方法

細胞

β c によるシグナル伝達の解析は、IL-3 依存性のマウス proB 細胞である Ba/F3 細胞 (parental Ba/F3)、あるいはこれに野生型および種々の変異型ヒト GM-CSF レセプターを安定発現させた細胞株 (Ba/F3-wild、-Y6、-Fall) を用いておこなった。STAT5 の関与の検討には構成的活性化型 STAT5 (STAT5A1*6) を安定発現させた Ba/F3 細胞株 (Ba/F3-STAT5A1*6) およびマウスの myelomonocytic cell line である WEHI 3B 細胞を用いた。

細胞への一過性遺伝子導入およびレポーター活性解析

NF- κ B および AP-1 の活性化を解析するため、各々の結合配列下流にルシフェラーゼ遺伝子をもつレポータープラスミドを使用した。STAT5 の転写活性解析には、 β -casein 遺伝子のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を融合したプラスミドを使用した。NF- κ B p65 の転写活性化能の解析には、転写因子 Gal4 結合配列下流にルシフェラーゼ遺伝子をもつレポータープラスミドを用いた。Ba/F3 細胞あるいは WEHI3B 細胞へのレポーター遺伝子あるいはレポーター遺伝子と各種発現プラスミドの一過性導入は、エレクトロポレーション法でおこなった。プラスミド遺伝子導入後 12 時間培養した細胞から調製した細胞溶解液を用いてルシフェラーゼ活性の測定をおこなった。

Northern Blot による IL-6 mRNA の解析

培養細胞から total RNA を抽出しアガロース・フォルムアルデヒド変性ゲルで電気泳動後ナイロンメンブレンへ転写し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識した IL-6 cDNA プローブとハイブリダイゼーションをおこなった。結果の解析はオートラジオグラフィによりおこなった。

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

NF- κ B あるいは STAT5 結合配列を有する 2 本鎖 DNA プローブを $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識して調製し、細胞より回収した核抽出液と結合反応をおこなった。結合の特異性は配列特異的あるいは非特異的な非標識プローブを用いた阻害実験により確認した。スーパーシフトアッセイは、結合反応においてプローブ添加前に種々の蛋白質に対する特異的抗体を加えることによりおこなった。結合反応後、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動しゲルを乾燥した後オートラジオグラフィにより解析した。

免疫細胞染色

Ba/F3 細胞を回収後スライドグラス上にサイトスピンを用いて付着させた。パラフォルムアルデヒドで固定した後、NF- κ B p65 蛋白に対するポリクローナル抗体との結合反応をおこなった。洗浄後、FITC で標識した二次抗体との結合反応をおこない、propidium iodide による核染色の後、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

イムノブロット法

全細胞抽出液、核抽出液あるいは細胞質抽出液のいずれかを SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動し、PVDF メンブレンへと転写した。転写した蛋白質は種々のポリクローナル抗体および HRP を付加した 2 次抗体との反応をおこなった。可視化およびデータの解析は ECL 法を用いた。

conditioned medium の調製

parental Ba/F3 細胞および Ba/F3-STAT5A1*6 細胞の培養上清を調製し、conditioned medium (CM) とした。すなわち、10%FCS を含む RPMI1640 培地 30 ml あたり 1×10^7 細胞の密度で 24 時間の培養を行った後の培地を回収し、遠心後の上清を CM とした。

結果

β_c による NF- κ B 活性化に関わるシグナル伝達経路の同定

IL-3 依存性マウス proB 細胞の parental Ba/F3 細胞およびこれに hGM-CSF 野生型レセプター α および β_c 両サブユニットを安定発現させた Ba/F3-wild 細胞を用いてレポーター遺伝子の一過性導入による NF- κ B 活性化を解析した。これら両細胞において内因性の β_c を介した IL-3 刺激により、また Ba/F3-wild 細胞においては hGM-CSF レセプターを介した hGM-CSF 刺激によっても NF- κ B 活性化が認められた。また、この NF- κ B 活性化は MEK1 キナーゼの特異的阻害剤および PI3-K の特異的阻害剤のいずれにおいても抑制を受けなかった。 β_c 変異レセプターの解析から、この NF- κ B 活性化には β_c の細胞内ドメインのチロシン残基が必要であることが示され、その位置要求性から NF- κ B 活性化に STAT5 の活性化に関わる可能性が示唆された。そして実際このことは、野生型 STAT5 の強制発現が β_c 下流での NF- κ B 活性を増強しうること、および構成的活性化型 STAT5 がサイトカイン非依存性に NF- κ B を活性化しうることにより確認された。さらに、STAT5 依存性の NF- κ B 活性化機構は Ba/F3 細胞において、例えばサイトカイン IL-6 など内因性の遺伝子発現に実際に寄与することも明らかとなった。

STAT5によるNF-κB活性化制御機構の解析

βc のシグナルは NF-κB の DNA 結合を増強することがゲルシフト法で示されたが、細胞質における抑制性蛋白 IκB のリン酸化および分解と、これに続く NF-κB 蛋白の細胞質から核への移行のステップは影響を受けなかった。つまり Ba/F3 細胞においては、ある一定量の NF-κB が構成的に核に局在しており、βc のシグナルはこの核局在の NF-κB の DNA 結合を変化させることにより NF-κB の転写活性を調節していることが判明した。そして、βc および STAT5 による NF-κB 活性化機構は、同じ Ba/F3 細胞を TNFα で刺激した場合に見られる、NF-κB の核移行を介する活性化機構とはきわめて異なるものであった。さらに、βc および STAT5 依存性 NF-κB 活性化は NF-κB の DNA 結合のみならず、p65 蛋白の C 末端側に存在する転写活性化領域を介する調節機構によっても担われることが明らかとなった。

NF-κB 活性化に与える STAT5 誘導性の液性因子に関する解析

Ba/F3 細胞での NF-κB 活性化過程に STAT5 のいかなる機能が必要であるかを、種々の STAT5 変異体を用いて解析した。この結果、STAT5 の DNA 結合と転写活性化領域の両者が必要であることが示され、STAT5 の標的遺伝子産物が 2 次的に NF-κB 活性化を制御している可能性が示唆された。実際、構成的活性化型 STAT5 を安定発現する細胞の培養上清中に Ba/F3 細胞の NF-κB 活性を誘導する生理活性が確認された。さらにこの未知の液性因子は、Ba/F3 細胞のみならず、たとえば WEHI 3B 細胞などの他の血球細胞においても NF-κB 活性化を誘導しうるということが明らかとなった。

考察

マウスの pro B 細胞である Ba/F3 細胞を用いた解析により、サイトカインレセプターβc の下流で転写因子 NF-κB が活性化される機構に、転写因子 STAT5 の活性が必須であることを明らかにした。また、STAT5 による NF-κB 活性化は、多くの細胞でみられる NF-κB 活性化機構と異なり、NF-κB の細胞質から核への刺激依存性の移行を伴わず、核内に局在する NF-κB の DNA 結合および p65 蛋白の転写活性化能の制御を介するものであった。さらに、この STAT5 依存性の NF-κB 活性化機構には、STAT5 依存性に発現し分泌される未知の液性因子が介在していることが明らかとなった。本研究における結果は、転写因子 NF-κB 活性化に至る新規のシグナル伝達経路が存在する可能性を提示すると同時に、NF-κB 活性化過程に介在する分子機構が細胞種あるいは上流の刺激の種類によりきわめて多様に制御されることを示唆するものと考えられる。また、STAT5 が直接の標的遺伝子のみならず、二次的な機構を介して NF-κB 依存性の転写活性を制御し、生体内においてこれまで知られる以上に多彩な遺伝子の発現調節に関わる可能性が考えられた。