

論文内容の要旨

論文題目 Functional Analyses of The Novel Zinc Finger Protein EZI
(新規 Zinc finger タンパク質 EZI の機能解析)

氏名 Kim Kyung-Woon (金 經雲)

1. 目的

サイトカインは細胞間の情報伝達を担う分泌性のタンパク質群で、個体の発生をはじめ免疫系や神経系など様々な生命の高次機能の形成と維持に必須の役割を果たしている。サイトカインは細胞膜上の受容体に結合して細胞内シグナル伝達経路を活性化し多彩な機能を発現する。サイトカイン受容体は構造的特徴からいくつかのファミリーに分類されている。免疫・造血系で主要な役割を果たしているインターロキンやインターフェロンの受容体自身にはキナーゼ活性がないが、受容体細胞内ドメインの膜近傍領域に Jak ファミリーのキナーゼが結合しており、サイトカインの受容体への結合により活性化されて受容体のチロシン残基をリン酸化する。リン酸化された受容体には様々なシグナル伝達分子が引き寄せられて Jak により活性化される。

STAT (signal transducer and activator of transcription) は SH2 ドメインとチロシンリン酸化部位をもち、多くのサイトカインのシグナル伝達において主要な役割を果たしている転写因子ファミリーで、哺乳動物においては STAT1、2、3、4、5a、5b、6 の7種類が存在する。不活性型 STAT は細胞質に存在し、サイトカイン受容体の活性化に伴いチロシンリン酸化された受容体に結合する。Jak によりチロシンリン酸化された STAT は SH2 ドメインにより互いのリン酸チロシンを認識し、2量体を形成する。この2量体は核に移行し、DNA に結合して標的遺伝子群の転写を制御する (図 1.)。最終的に STAT は脱リン酸化を受けて、核から再び細胞質へと移行する。すなわち、STAT がその機能を発現するためには

細胞質から核内への移行が必須であるが、STAT には配列上明らかな（典型的な）核移行シグナルが見いだされず、どのような仕組みで核へ移行するのか不明であった。最近チロシンリン酸化を受けた STAT1 には、核膜孔へのタ - ゲィンクに必要な Importin / 複合体が結合すること、またこの結合には STAT1 上の新規の（典型的でない）核移行シグナルが必要であることが報告された。しかしながら、STAT3 に関しては STAT1 とはまた異なる核移行のメカニズムが存在すると考えられており、その実体は未だ明らかとなっていない。

STAT3 はインターロイキン - 6 (IL-6) ファミリーのサイトカインや EGF により活性化され、細胞の増殖・分化、生存維持などにおいて中心的な役割を果たしている。さらに、v-src などのがん遺伝子によっても活性化され、細胞の癌化への関与が指摘されている。本研究では、がん細胞の増殖抑制因子として見いだされた IL-6 ファミリー、オンコスタチン M (OSM) が AGM (aorta-gonad-mesonephros) 領域での造血発生を促進するという現象を解析する過程で、OSM の刺激によって内皮様細胞から誘導される遺伝子として EZI (endothelial cell-derived zinc finger protein) を同定し、その機能解析を行った。EZI は、12 個の Zinc finger (ZF) モチーフを有する新規のタンパク質であり、EZI の機能解析を通じて、これが STAT3 の活性化を制御する重要な因子であることを見出し、さらにその作用の分子メカニズムを明らかにした。

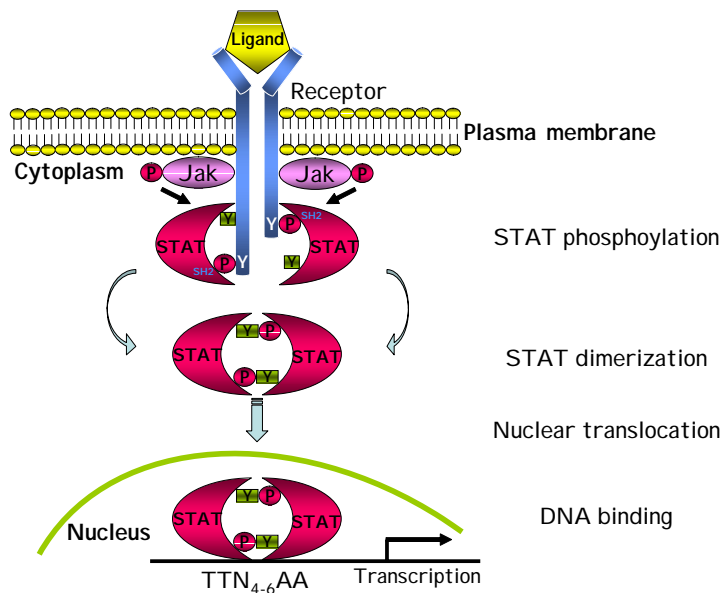


図 1 . Jak-STAT シグナル経路。

2. 結果と考察

EZI は STAT3 の活性化を促進する。

まず、EZI の詳細な発現について解析を行った結果、EZI 発見当初の結果とは異なり、OSM による EZI の誘導性は弱く、内皮細胞以外にも様々な細胞や組織で構成的に発現していた。EZI は ZF モチーフをもつことから、転写因子である可能性を考え、様々なプロモーターを介した転写活性化に対する作用を検討した結果、EZI には acute phase response element (APRE) など STAT3 により転写が誘導されるプロモーターからの発現を促進する作用があった。一方、免疫沈降法により、EZI と STAT3 には物理的な相互作用があることが明らかとなり、さらに EZI の欠失変異体を作製し解析することで、STAT3 との結合領域を同定した。STAT3 結合領域を欠失した EZI 変異体では STAT3 依存的転写活性化の促進は見られなかったことから、EZI と STAT3 は細胞内で協調的に作用することが示唆された。また、EZI は核内に局在しており STAT3 の核移行を促進するが、STAT3 結合領域を持ち ZF を欠失した EZI 変異体は細胞質に局在し、STAT3 の核移行と STAT3 依存的転写活性化を抑制した。以上の結果から、EZI は STAT3 に結合して STAT3 の核移行を促進し、核内に留めて STAT3 の活性化を促進することが示された。

EZI による STAT3 核移行の抑制

EZI の変異体を過剰発現させたこれまでの実験から、この分子が STAT3 の活性化に重要な機能を担っていることが示唆された。そこで、EZI を標的とする siRNA を用いて内在性の EZI の発現を抑制した場合の、STAT3 の核移行および核局在化および STAT3 依存的転写活性化に対する影響を検討した。作製した EZI siRNA によって内在性 EZI の発現量は減少し、それに伴って、OSM 刺激による STAT3 依存的転写活性化も抑制された。さらに siRNA により EZI の発現が抑制された細胞では、OSM による STAT3 の核移行および核局在化が阻害されていた。したがって、EZI は STAT3 の核移行および核局在に必須の機能があることが明らかとなった。また、核移行できない既知の STAT3 変異体では EZI との結合能が失われていたことから、STAT3 の核移行における EZI の関与が支持された。

EZI の核移行のメカニズム

EZI は主に核に局在するタンパク質であったが、EZI の欠失変異体を用いた解析の結果、全ての ZF モチーフを欠損した変異体においてその核への移行が阻害された。そこで EZI の核移行のシグナルを同定するため、EZI の ZF モチーフを段階的に欠損させた変異体を多数作成し、それらの核移行能力を検討した。その結果、EZI の核局在には 3 番目と 8 番目の ZF モチーフが重要であった。さらに、その変異体は STAT3 依存的転写活性化を阻害した。一方、プロテオミクス法を用いた EZI に結合するタンパク質の解析から Importin 7 が見いだされ、siRNA により Importin 7 の発現を抑制すると EZI の核移行が抑制された。以上の

結果から、EZI は Importin 7 を介して STAT3 の核への移行を制御している可能性が強く示唆された。

オリゴヌクレオチドデコイとペプチドによる STAT3 の活性化阻害

EZI は DNA に結合する分子であり、STAT3 と同様に APRE 配列に結合することができる。そこで、EZI に結合するオリゴヌクレオチド（デコイ）を細胞に導入することにより、内在性の EZI の活性が阻害されるか、さらに STAT3 の活性化にも影響があるかどうか検討した。APRE に種々の変異を導入したオリゴヌクレオチドを作製し、EZI とより強く結合する変異体を見出した。このオリゴヌクレオチド（EZI デコイ）を導入した細胞では、EZI は核へ移行せずに細胞質に溜まっており、OSM 刺激に従う STAT3 の核移行も阻害されていた。また、STAT3 依存性の転写活性化も抑制された。したがって、EZI デコイは細胞質で EZI と STAT3 に結合して、これらの複合体の核への移行を阻害することが示唆された。

一方、EZI の N 末端領域に存在する STAT3 結合領域に関して、さらに変異体を作製して詳細な解析を行ったところ、91 アミノ酸からなるドメインが結合に必須な領域であり、特に 4 残基の酸性アミノ酸からなるモチーフが重要であることを見出した。このモチーフを含む 7 アミノ酸からなるペプチドを合成し、膜透過シグナルを付加して細胞に導入したところ、このペプチドは STAT3 とともに細胞質に留まり、STAT3 の核移行を阻害することが明らかとなった。

3. 結論

本研究では、新規 ZF タンパク質 EZI の機能解析を行い、EZI は STAT3 の活性化において必須の因子であることを明らかにした。すなわち、EZI は活性化 STAT3 を Importin 7 とともに核に移行させる重要な因子であり、核内では STAT3 とともに DNA に結合して転写能力を高めることが強く示唆された。STAT3 の核移行の機構は未解決の重要な課題であったが、EZI の発見により STAT3 の核移行機構解明の突破口が開かれた。本研究により細胞レベルでの EZI の機能は明らかになったが、今後は EZI 欠損マウスの作製などにより生体での機能解析が期待される。また、EZI と STAT3 との間にみられた協調的な作用が他の STAT についても存在するのか、今後の解析が期待される。さらに、EZI 結合オリゴヌクレオチド（EZI デコイ）および EZI 由来の STAT3 結合ペプチドは、いずれも STAT3 の新たな活性阻害剤としての可能性が考えられる。