

PMLによるIL-6/STAT3シグナル伝達制御機構の解析

学位論文内容の要旨

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)は肝臓において急性期タンパク質結合因子として発見された転写因子である。STAT3の活性化様式を以下に示す。まず、Interleukin-6 (IL-6)や Leukemia inhibitory factor (LIF)に代表されるIL-6ファミリーサイトカインが細胞膜表面上に存在するIL-6レセプターに結合するとレセプター複合体の重合が起こり、レセプター複合体の細胞内ドメインに会合しているJanus tyrosine kinase (JAK)チロシンキナーゼが活性化する。活性化JAKによってSTAT3の705番目のチロシン残基がリン酸化され、STAT3は二量体を形成し、核に移行する。そして核内で標的遺伝子配列と結合し、Mcl-1やCyclinD1など種々のアポトーシスまたは細胞周期関連遺伝子の転写を調節することで細胞増殖や生存等様々な生理機能に関与する。STAT3は多くの癌や癌細胞株で恒常的な活性化が認められており、癌化に寄与することが知られている。このことからSTAT3は癌治療の標的分子として着目されており、STAT3の異常な活性化やSTAT3シグナル経路を抑制することが新たな治療法として考えられている。

本研究では、STAT3の細胞内制御機構をさらに詳細に解明することを目的とし、STAT3活性化制御因子の一つであるPromyelocytic leukemia (PML)に着目した。

PMLは急性前骨髄性白血病患者においてt(15;17)の転座によりPML遺伝子とレチノイン酸受容体遺伝子が融合し、PML-RAR α を合成していることで発見されたタンパク質である。PMLは核に局在し、PML-nuclear body (NB)と呼ばれる複数のタンパク質からなる核内構造体を形成している。NBは集積するタンパク質の機能を調節することで、DNAダメージや修復、アポトーシス、老化、細胞周期、転写、発癌、ウイルス感染などに関与する。これまで他のグループによりPMLがSTAT3と会合することが報告されていた。しかしながらPMLのSTAT3シグナルにおける役割については不明であった。そこで本研究においてはPMLによるIL-6/STAT3シグナル制御機構を解明する目的で種々の検証を行った。

また、PMLは分子内の3ヶ所のリジン残基においてSUMO化修飾を受けることが知られている。このSUMO化修飾はNBの形成に必要であり、PML自身あるいはNBに集積する多くのタンパク質がSUMO化修飾されることで種々の機能を発揮することが知られている。そこで、本研究においてはIL-6/STAT3シグナルにおけるPMLのSUMO化修飾の役割について検討した。

まず、IL-6/STAT3シグナル伝達におけるPMLの役割について検証し、以下のことを明らかにした。また、PMLはSTAT3の転写活性を負に制御することを示した。次にPMLノックダウンにより、IL-6刺激時においてSTAT3のチロシン残基のリン酸化とセリン残基のリン酸化が増強されること、ならびにセリン残基のリン酸化は未刺激時において有意に増強されることを示した。また、PMLノックダウンにより、STAT3特異的ホスファターゼであるPP2AによるSTAT3のセリン脱リ

ン酸化が抑制されること、また、内在性 PP2A が内在性 PML ならびに過剰発現 PML と共局在することを示した。次に、内在性の STAT3 は IL-6 刺激時と未刺激時ともに内在性の PML と共局在しないが、STAT3 と PML をそれぞれ過剰発現することで両者が共局在するという結果が得られた。さらに、STAT3 と PML が会合すること、PML が STAT3 と PP2A の会合を増強することならびに STAT3、PML および PP2A が 3 者複合体を形成することを示した。また、PML ノックダウンにより STAT3 の核外排出が抑制すること、ならびに STAT3 標的遺伝子の mRNA 誘導が増強されることを明らかにした。

続いて、IL-6/STAT3 シグナル伝達における SUMO 化 PML の役割について検証し、以下のことを明らかにした。まず、SUMO 化 PML は PML による STAT3 の転写活性抑制を増強すること、ならびに脱 SUMO 化酵素 SENP1 によりその増強が回復することを明らかにした。また SUMO 化能を欠失した PML 変異体は野生型と比較して PML による STAT3 の転写活性抑制の増強が認められなかった。さらに STAT3 と PML の会合が SUMO1 により増強されること、また、SUMO 化 PML が STAT3 と会合すること、PML による STAT3 と PP2A の結合の増強が SUMO 化によりさらに強まることを示した。以上の結果より、PML の SUMO 化は PML による STAT3 活性化抑制制御機構に重要な役割を果たすことが示唆された。

以上、本研究において PML が PP2A によるセリン残基の脱リン酸化を抑制することで IL-6/STAT3 シグナル伝達を負に制御すること、ならびに SUMO 化 PML がその作用を増強することを明らかにした。

以上の結果より以下に示すモデルを想定した。

正常細胞において、STAT3 は NB ヘリクルートされ、NB に局在している PP2A により脱リン酸化されることでその転写活性が抑制されている。また、PML の SUMO 化修飾がその作用を増強している。しかし、癌細胞においては PML が欠失している、あるいは PML の発現量が減弱しているため PP2A による STAT3 の脱リン酸化やそれに伴う STAT3 の核外排出が抑制されること、ならびに転写活性の抑制が行われないため STAT3 が核内で恒常的に活性化していることが予想される。また、癌組織では IL-6 が高発現していることが知られており、この IL-6 により誘導された SENP1 が PML の脱 SUMO 化を誘導することで PML による STAT3 の抑制が減弱し、種々の STAT3 標的遺伝子の転写活性が増強することで癌細胞の増殖や生存に繋がるというモデルを想定している。

多くの研究により、活性化 STAT3 と癌との関連が明らかとされていることから、活性化 STAT3 の抑制が癌に対する治療の有効な戦略法として考えられている。今後、PML による詳細な STAT3 制御機構に関する研究が進むことで癌化メカニズムの解明や新たな治療薬開発の手掛かりとなることを望む。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	松 田	正
副 査	教 授	菅 原	満
副 査	准教授	武 隈	洋
副 査	講 師	南 保	明日香

学位論文題名

PMLによるIL-6/STAT3シグナル伝達制御機構の解析

本研究では、抗癌剤の創薬における分子標的として注目される STAT3 の細胞内制御機構の解明を目的とし、Promyelocytic leukemia (PML) タンパク質に着目した。PML は核に局在し、PML-nuclear body (NB) と呼ばれる複数のタンパク質からなる核内構造体を形成する。PML は NB に集積するこれらのタンパク質の機能を調節することでアポトーシス、発癌などに関与する。これまで STAT3 は PML と会合すると報告されていたものの PML が STAT3 シグナルに対してどのような影響を及ぼすかは不明であった。そこで本研究では PML による IL-6/STAT3 シグナル制御機構を解明する目的で以下に示す解析を行い、以下の点を明らかにしており、博士（生命科学）の学位を授与するに十分であると判断した。

ヒト胎性腎癌細胞株 293T 細胞に PML と STAT3 を共発現させ、IL-6 ファミリーサイトカインの一つである LIF 刺激時または未刺激時における両者の相互作用を免疫沈降法により解析した。その結果、LIF 刺激、未刺激時に関わらず両者の会合が観察された。また、ヒト肝癌細胞株 Hep3B 細胞内での STAT3 および PML の局在を免疫染色法により検討し、両者が共局在することを明らかにした。以上の結果より、細胞内において PML は STAT3 と直接相互作用することが示した。上記で得られた結果から PML が STAT3 シグナル伝達系の下流において役割を果たす可能性が示唆された。そこで次に PML の IL-6/STAT3 シグナル伝達系における役割を検討した。

まず、 α 2-マクログロブリンプロモーター内の STAT3 結合部位をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだ STAT3-Luc および PML4 を導入した Hep3B 細胞に IL-6 処理を行い、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、PML の発現量依存的に STAT3 の転写活性が抑制された。さらに、shRNA を用いて PML の発現を恒常的に抑制した Hep3B 細胞株 (PML shRNA 株) を用いて同様に解析したところ、対照と比較して、IL-6 による STAT3 活性化が有意に増強した。以上の結果より、PML は IL-6/STAT3 シグナル伝達系を負に制御することを明らかにした。さらにその分子機構として、PML が STAT3 のリン酸化の抑制や STAT3 の核外排出を制御することにより、転写活性を負に抑制することを示した。また、STAT3 のリン酸化制御に関して、PML とホスファターゼ Protein phosphatase 2A (PP2A) をとの関連を解析し、PML が PP2A による STAT3 転写活性抑制を亢進することも示した。

PML は主に Small ubiquitin-related modifier (SUMO) 化修飾を受けることでその機能を発揮することが知られているが、PML の SUMO 化修飾が IL-6/STAT3 シグナル伝達系の制御機構に関与するか否かを検討した。まず、PML の SUMO 化修飾が PML による STAT3 転写活性の抑制に関与するか否かを検討するため、PML および SUMO1 を導入した Hep3B 細胞を IL-6 刺激し、STAT3-Luc を用い

たルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、PML による STAT3 の転写活性抑制が SUMO1 を発現する事でさらに増強した。また PML は分子内に 3 ヶ所の SUMO 化修飾リジン残基を有するが、これらのリジン残基全てをアルギニンに変異し SUMO 化修飾能を消失させた変異体 (PML3KR) を用いて同様の解析を行なったところ、野生型 PML と比較して STAT3 の転写活性の抑制が認められなかった。以上の結果より PML による STAT3 転写活性の抑制において PML の SUMO 化修飾が重要な役割を果たすことを明らかにした。

本研究では、PML による IL-6/STAT3 シグナル伝達系制御機構の解析を行い、PML が PP2A を介して STAT3 のリン酸化を減弱させ STAT3 の転写活性を抑制すること、さらにその分子メカニズムのひとつとして PML の SUMO 化修飾が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

論文発表に続いて、発表内容を中心として関連ある専門分野を含めた口頭試問を実施した。その内容は、本研究の背景、目的および関連分野等における知識、また得られた知見の創薬への応用、および残された課題など多岐に亘った。これらに対する回答は適切なものであり、博士の学位を与えるに相応しいと判断した。

提出された学位論文の内容はよくまとまっており、その研究成果は独創的かつ有用性に富み、本専門研究分野の中で高く評価されるに値する内容であると判断した。以上の結果、本論文審査委員会は、川上 志保氏を博士（生命科学）の学位を授与するに相応しい十分な学力と研究能力を有するものと認めた。