

学位論文題名

細胞内シグナル伝達におけるセリンリン酸化制御タンパク
の機能解析

学位論文内容の要旨

生体において細胞集団が組織としての役割を果たすために、細胞間では様々な情報交換が行われている。そのために必要な細胞間伝達分子として代表的なものがサイトカインであり、サイトカインはレセプターを介して細胞内シグナルを活性化することでその生理活性を発現する。その中でも炎症性サイトカインである IL-6 は、免疫系細胞の増殖や分化誘導、炎症時の肝臓における急性期タンパク質誘導を始め、多種多様な細胞に働く多機能分子である。また、IL-6 は細胞内シグナル伝達機構としてサイトカイン特有な JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) シグナル系を用いており、STAT ファミリータンパク質の中でも STAT3 を主に活性化する。IL-6 の結合によりレセプター複合体が重合するとレセプター会合性チロシンキナーゼである JAK が活性化する。活性化した JAK は STAT3 の 705 番目のチロシン残基をリン酸化し、リン酸化された STAT3 は二量体化し核へと移行する。そして核内で標的遺伝子配列と結合し、標的遺伝子群の転写を活性化する。STAT3 の制御機構の破綻による恒常的な STAT3 活性化は多くのがんや自己免疫疾患と深く関連しており、STAT3 制御機構の解明はそれら治療薬開発に向けて重要な手がかりとなると考えられる。

STAT3 はリン酸化やアセチル化など様々な翻訳後修飾を介してその機能が制御されることが報告されているが、特に 705 番目のチロシン残基のリン酸化は上述したように STAT3 の活性化に必須であり、その役割や制御機構について非常によく研究されている。一方で 727 番目のセリン残基のリン酸化や 685 番目のリジン残基のアセチル化などの修飾も STAT3 の機能を正に制御することは知られているものの、あくまで補助的な機能と考えられており、その詳細な制御機構や役割などについてはいまだ不明な点が多い。しかし近年、慢性リンパ球性白血病 (CLL) の患者の B 細胞において恒常的なセリンリン酸化 STAT3 が発見されるなど、STAT3 のセリンリン酸化も重要な機能を持つ可能性が示唆され注目されつつある。

そこで本研究ではこの STAT3 のセリンリン酸化に着目し、その詳細な制御機構を解析するとともに (第 1 章)、新規 STAT3 セリンリン酸化酵素 ZIPK の他シグナル伝達系における機能解析を行った (第 2 章)。

第 1 章 脱アセチル化酵素 HDAC3 による STAT3 セリンリン酸化制御機構の解析

STAT3 の 685 番目のリジン残基のアセチル化は、STAT3 の 2 量体構造の維持など STAT3 の活性化に重要な修飾である。そして HDAC3 はそのアセチル化を負に制御する脱アセチル化酵素として知られている。この HDAC に対する阻害剤 TrichostatinA (TSA) を処理したところ、STAT3 のセリンリン酸化が大きく亢進することが分かった。一方で、チロシンリン酸化に対しては影響しなかった。さらに siRNA 導入による HDAC3 ノックダウンでも同様の結果が見られたことから、HDAC3 は STAT3 のセリンリン酸化に対して負に作用することが示唆された。そこで HDAC3 による STAT3 セリンリン酸化への作用機序を明らかとするために、STAT3 のセリン脱リン酸化酵素として知られる Serine/Threonine protein phosphatase 2A (PP2A) に着目した。その結果、HDAC3 のノックダウンにより PP2A による STAT3 セリン脱リン酸化が弱まる結果が得られた。このことから、HDAC3 は PP2A

を介して STAT3 のセリンリン酸化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、HDAC3 と PP2A の相互作用を検討した結果、HDAC3 は PP2A、STAT3 それぞれと相互作用し三者複合体を形成すること、また PP2A と STAT3 の結合は HDAC3 により強まることが明らかになった。

実際 HDAC3 と PP2A による STAT3 転写活性への影響をルシフェラーゼアッセイ法により検討したところ、両者を同時にノックダウンすることで単独ノックダウンに比べて STAT3 の転写活性は大きく増強した。以上の結果から、HDAC3 と PP2A は協調的に STAT3 のセリンリン酸化を負に制御することで STAT3 の転写活性を抑制することが示唆された。

第2章 Zipper-interacting Protein Kinase (ZIPK)による Wnt/ β -catenin シグナル制御機構の解析

Zipper-interacting protein kinase (ZIPK)は、Death associated protein kinase (DAPK)ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼであり、そのキナーゼ活性依存的にアポトーシスを亢進することが知られている。その一方で当研究室ではIL-6/STAT3シグナルにおいてZIPKがSTAT3のセリンリン酸化を介してSTAT3シグナルを正に制御することを明らかとしており、サイトカインシグナル伝達系においても重要な役割を担うことが分かってきた。

今回我々は新たなZIPKの細胞内機能を探るため、ZIPKのキナーゼドメインをベイトとしたYeast two-hybrid法を用いて新規ZIPK結合分子を探索し、その結果Nemo-like kinase (NLK)を同定した。NLKはWnt/ β -cateninシグナルにおいて、転写因子であるT-cell factor 4 (TCF4)をリン酸化し、TCF4のユビキチン・プロテアソーム分解を促すことでWnt/ β -cateninを負に制御することが知られている。そのため、ZIPKがNLKを介しWnt/ β -cateninシグナルを制御する可能性が考えられ、本研究ではWnt/ β -cateninシグナルにおけるZIPKとNLKの機能的相互作用を解析した。

まず、ZIPKによるWnt/ β -cateninシグナルへの影響を検討するため、siRNAによりZIPK遺伝子をノックダウンし、ルシフェラーゼアッセイによりTCF4転写活性への影響を解析した。その結果、ZIPK遺伝子ノックダウンで、Wnt/ β -cateninシグナルは抑制されることが分かった。また、ZIPKはNLKとTCF4両者と直接結合し、NLK-TCF4複合体形成ならびにNLKによるTCF4リン酸化を阻害した。これらのことからZIPKはTCF4に対するNLKの機能を物理的に阻害することでWnt/ β -cateninシグナルを正に制御する可能性が示唆された。

また、Wnt/ β -cateninシグナルの恒常的な活性化は発がんの引き金となることが知られており、特に家族性大腸腺腫症に代表される大腸がんの多くではWnt/ β -cateninシグナルの恒常的な活性化が観察されている。そこで次にZIPKによるWnt/ β -cateninシグナルを介した細胞機能への影響を検討するため、これら大腸がん細胞を用いてZIPK遺伝子ノックダウンを行った。その結果、Wnt標的遺伝子の発現減弱ならびにがん細胞の増殖能の低下が見られた。以上のことから、ZIPKは大腸がん細胞においてもWnt/ β -cateninシグナルを正に制御する可能性が示唆された。

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 講 師 南 保 明日香
副 査 准教授 織 谷 健 司 (大阪大学大学院医学系研究科)

学位論文題名

細胞内シグナル伝達におけるセリンリン酸化制御タンパクの機能解析

博士學位論文審査等の結果について (報告)

炎症性サイトカインである IL-6 は、免疫系細胞の増殖や分化誘導、炎症時の肝臓における急性期タンパク質誘導を始め、多種多彩な細胞に働く多機能分子である。また、IL-6 は細胞内シグナル伝達機構としてサイトカイン特有な JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) シグナル系を用いている。STAT3 の制御機構の破綻による恒常的な STAT3 活性化は多くのがんや自己免疫疾患と深く関連しており、STAT3 制御機構の解明はそれら治療薬開発に向けて重要な手がかりとなると考えられる。

STAT3 はリン酸化やアセチル化など様々な翻訳後修飾を介してその機能が制御されることが報告されているが、特に 705 番目のチロシン残基のリン酸化は STAT3 の活性化に必須であり、その役割や制御機構について非常によく研究されている。一方で 727 番目のセリン残基のリン酸化や 685 番目のリジン残基のアセチル化などの修飾も STAT3 の機能を正に制御することは知られているものの、あくまで補助的な機能と考えられており、その詳細な制御機構や役割などについてはいまだ不明な点が多い。そこで本研究ではこの STAT3 のセリンリン酸化に着目し、その詳細な制御機構を解析するとともに(第 1 章)、新規 STAT3 セリンリン酸化酵素 ZIPK の他シグナル伝達系における機能解析を行い(第 2 章)、以下の点を明らかにしており、博士(薬科学)の学位を授与するに十分であると判断した。

第 1 章 脱アセチル化酵素 HDAC3 による STAT3 セリンリン酸化制御機構の解析

STAT3 の 685 番目のリジン残基のアセチル化は、STAT3 の 2 量体構造の維持など STAT3 の活性化に重要な修飾である。そして HDAC3 はそのアセチル化を負に制御する脱アセチル化酵素として知られている。今回 HDAC 阻害剤 TrichostatinA (TSA) 処理、もしくは siRNA 導入による HDAC3 ノックダウンにより STAT3 のセリンリン酸化が大きく亢進したことから、HDAC3 は STAT3 のセリンリン酸化に対して負に作用することが示唆された。そこで HDAC3 による STAT3 セリンリン酸化への作用機序を明らかにするために、STAT3 のセリン脱リン酸化酵素として知られる Serine/Threonine protein phosphatase 2A (PP2A) に着目した。その結果、HDAC3 のノックダウンにより PP2A による STAT3 セリン脱リン酸化が弱まること、また PP2A と STAT3 の結合は HDAC3 により強まることが明らかになった。またルシフェラーゼアッセイを用いた解析により HDAC3 と PP2A 両者を同時にノックダウンすることで単独ノックダウンに比べて STAT3 の転写活性は大きく増強した。以上の結果から、HDAC3 と PP2A は協調的に STAT3 のセリンリン酸化を負に制御することで STAT3 の転写活性を抑制することを明らかにした。

第 2 章 Zipper-interacting Protein Kinase (ZIPK) による Wnt/ β -catenin シグナル制御機構の解析

Zipper-interacting protein kinase (ZIPK) は、Death associated protein kinase (DAPK) ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼであり、そのキナーゼ活性依存的にアポトーシスを亢進することや、ZIPK が STAT3 のセリンリン酸化を介して STAT3 シグナルを正に制御することも示されているが、明らかとしている。今回、新規 ZIPK 結合分子として Wnt/ β -catenin に関わる NLK を同定したことから、ルシフェラーゼアッセイを用いた解析により ZIPK ノックダウン時に Wnt/ β -catenin シグナル下流の転写因子 T-cell factor 4 (TCF4) の転写活性が減弱することを明らかとした。また、NLK は TCF4 をリン酸化することで Wnt/ β -catenin を負に制御することが知られているが、ZIPK は NLK-TCF4 複合体形成ならびに NLK による TCF4 リン酸化を阻害することも明らかとした。このことより ZIPK は TCF4 に対する NLK の機能を阻害することで Wnt/ β -catenin シグナルを正に制御する可能性を示している。さらに Wnt/ β -catenin シグナルが恒常的な活性化した大腸がん細胞において ZIPK をノックダウンしたときに、Wnt

標的遺伝子の発現減弱ならびにがん細胞の増殖能の低下が見られた。以上のことから、ZIPKはアポトーシス促進だけでなく、Wnt/ β -cateninシグナルを介した細胞増殖においても重要な機能を持つ可能性を明らかにした。

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、**剛 澄仁氏**を博士（薬科学）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。