

氏 名（本籍） 黒 田 宙

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 博 第 1 4 3 5 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 10 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科
(博 士 課 程) 内 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 サイトカイン受容体/Jak キナーゼからのシグナル伝達に関わる新規情報伝達分子 STAM (signal transducing adaptor molecule) と Stat 5 (signal transducers and activators of transcription 5) の会合

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 糸 山 泰 人 教 授 佐 竹 正 延

教 授 田 村 眞 理

論文内容要旨

サイトカイン受容体からのシグナル伝達経路を解析する過程で、ヒト T 細胞株より我々のグループが遺伝子単離した STAM (signal transducing adaptor molecule) は、サイトカイン受容体/Jak キナーゼから c-myc 発現誘導や細胞増殖に至るシグナル伝達に関わることがわかった。しかしながら、STAM 下流のシグナル伝達経路はまだ不明である。本研究では、STAM を介するシグナル伝達機構を解明するために、STAM と会合する分子を同定し、その機能を解析することを目的とした。

IL-2 反応性ヒト T 細胞株 MOLT β を IL-2 で、GM-CSF 反応性ヒト赤白血病細胞株 TF-1 を GM-CSF で刺激し、得られた細胞抽出液を抗 STAM 抗体で免疫沈降すると約 97kDa のチロシンリン酸化蛋白が共沈した。この分子量はこれらサイトカイン刺激によってチロシンリン酸化される Stat5 (signal transducers and activators of transcription5) の分子量と一致した。そこで、上記サイトカイン刺激前後の細胞抽出液について、先ず抗 STAM 抗体で免疫沈降し、その後抗 Stat5 抗体でイムノブロットを行ったところ、サイトカイン刺激前には認められなかった STAM と Stat5 の会合が刺激後に認められた。STAM と Stat5 との会合は抗 Stat5 抗体で免疫沈降後に抗 STAM 抗体でイムノブロットを行っても確かめられた。しかし、IL-6 反応性ヒト形質細胞株 U266 を IL-6 で刺激した際に STAM と Stat3 の共沈は認められず、STAM は Stat5 と特異的に会合すると考えられた。

Stat5 はサイトカイン刺激後に細胞質から核へ移行し、種々の遺伝子の転写を活性化することが知られている。そこで、TF-1 細胞を用い細胞分画・イムノブロットを行ったところ、STAM と Stat5 の複合体は核へは移行しないことが明らかになった。したがって、この複合体形成はサイトカイン受容体/Jak キナーゼ近傍で起きると考えられた。

マウスプロ B 細胞 BAF-B03 細胞を用いた STAM の強制発現実験では、Stat5 誘導遺伝子プロモーターの転写活性化が認められた。それに対し、チロシンクラスター領域を欠失させた変異体では上記のプロモーター活性の上昇がまったく認められないこと、STAM の SH3 ドメインを欠失させた変異体では野生型 STAM 以上のプロモーター活性の上昇が認められることから、STAM はそのチロシンクラスター領域を介して Stat5 の転写活性化を増強するが、SH3 ドメインには転写を抑制するような分子が結合している可能性が考えられた。

以上から、STAM がシグナル伝達アダプター分子としてサイトカイン受容体/Jak キナーゼ近傍で Stat5 を Jak キナーゼに会合させ、Jaks による Stat5 のリン酸化と活性化の効率が促進されている可能性が示唆された。

審査結果の要旨

サイトカイン受容体からのシグナル伝達経路を解析する過程で、先に申請者らが遺伝子単離した STAM は、サイトカイン受容体/Jak キナーゼから *c-myc* 発現誘導や細胞増殖に至るシグナル伝達に関わることがわかった。しかしながら、STAM 下流のシグナル伝達経路にはまだ不明の点が多かった。

本論文は STAM と会合する分子として Stat5 を同定し、あわせて Stat5 により誘導される遺伝子の発現に STAM とその変異体が及ぼす影響を解析したものである。

IL-2 反応性ヒト T 細胞株 MOLT β および GM-CSF 反応性ヒト赤白血病細胞株 TF-1 を用いた実験系で、STAM と Stat5 がサイトカイン刺激依存性に会合していることを明らかにした。しかし、IL-6 反応性ヒト形質細胞株 U266 を用いた実験系では STAM と Stat3 の共沈は認められず、STAM は Stat5 と特異的に会合すると考えられた。

Stat5 はサイトカイン刺激後に細胞質から核へ移行し、種々の遺伝子の転写を活性化することが知られている。そこで、TF-1 細胞を用い細胞分画・イムノプロット解析を行った結果、STAM と Stat5 の複合体は核へは移行しないことが明らかになった。したがって、この複合体形成はサイトカイン受容体/Jak キナーゼ近傍で起きる可能性が考えられた。

Stat5 活性化の指標としてオンコスタチン M/ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を用い、STAM およびその変異体の導入が Stat5 の活性化に及ぼす影響を解析した。その結果、野生型 STAM の導入によりオンコスタチン M のプロモーター活性の上昇が認められた。それに対し、チロシンクラスター領域を欠失させた変異体ではプロモーター活性上昇が認められなかった。また、STAM の SH3 ドメインを欠失させた変異体では野生型 STAM 以上のプロモーター活性上昇が認められた。したがって、STAM はそのチロシンクラスター領域を介して Stat5 の転写活性化を増強するが、SH3 ドメインには転写を抑制するような分子が結合している可能性が考えられた。

以上から、STAM がシグナル伝達アダプター分子としてサイトカイン受容体/Jak キナーゼ近傍で Stat5 を Jak キナーゼに会合させ、Jaks による Stat5 のリン酸化と活性化の効率が促進されている可能性が示唆された。

本論文は IL-2, GM-CSF 刺激系における STAM の重要性を示し、Stat5 の活性化機構についても新たな知見を与えた。この研究結果はサイトカイン受容体からのシグナル伝達機構の解明にとって重要である。よって本論文は博士号授与に値する研究とみなす。