

氏 名（本籍）	葛 西 宏 威 か さい ひろ たけ
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 1 5 9 1 号
学位授与年月日	平 成 1 2 年 3 月 2 3 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）病理学系専攻
学位論文題目	IL-2 依存性細胞増殖機構に関する研究 －STAM-SH3 会合分子の同定及び機能解析－

（主 査）

論文審査委員	教授 菅 村 和 夫	教授 佐 竹 正 延
	教授 土 屋 滋	

論文内容要旨

当研究室では、IL-2のシグナル伝達系においてDNA合成、c-mycの発現に関わる経路として、JAK3-STAM経路を同定してきた。STAMのSH3欠損変異体の強発現は、IL-2刺激後のDNA合成を抑制する。このことから、STAM-SH3に会合する分子がIL-2のシグナル伝達系において、DNA合成、細胞増殖へと至るシグナル伝達系路において重要な役割を担っていると考えられた。

本研究は、IL-2伝達系におけるSTAM-SH3の重要性に注目し、STAM-SH3に会合しIL-2の細胞増殖作用に関与する分子を同定し、さらに、個々の分子の機能を明確にすることにより、T細胞の増殖の分子メカニズムを明らかにしていくことを目的に遂行した。

STAM-SH3のGST融合蛋白をプローブとしたFar-Western法によって3つの会合分子を同定した。そのうちの一つAMSHはc-myc発現誘導、DNA合成に関与することが明らかになっている。(参考論文参照)本論文では、同様に単離された分子UBPYについて解析を行った。UBPYは、脱ユビキチン化酵素活性有する1118アミノ酸からなる、分子量約140kDaの分子で、C-末端領域に脱ユビキチン化酵素活性、N-末端にcoiled-coil構造、プロリン残基に富む領域が存在した。STAM-SH3との会合に関して、PXXP構造を介さない結合様式をとりAMSHと競合しない。UBPYの発現は全ての臓器で認められた。UBPYは、細胞周期の進行と共に発現し、G1期においてプロセッシングを受ける。IL-2刺激に伴うc-myc発現誘導、DNA合成誘導に対する影響を検討した結果、N-末端領域を欠損させた変異体(以下UD3)の発現によって、DNA合成、c-myc発現誘導が抑制された。また、UD3発現誘導系を導入したBAF細胞では、UD3発現を誘導下で細胞増殖は抑制された。これらの抑制効果は脱ユビキチン化酵素活性依存的であった。これらのことから、N-末端を介した機能の制御が想定された。野生型UBPY(以下UBPY)とUD3の酵素活性を比較したところ、細胞内で、脱ユビキチン化能に差が見られた。しかし、分子自身の酵素活性は差が見られない。UBPYとUD3の細胞内局在を比較すると、UBPYは細胞質内に局在するのに対しUD3は核内に局在する。UBPYのプロセッシング産物について局在を検討すると、C-末端の断片のみが核分画において検出された。このことから、UBPYはプロセッシング後C-末端側の断片が核に移行することが示された。UD3には双極型のNLSに相当する配列が認められた。この部分まで、欠損させた変異体(以下dNLS)はGFPのみと同様の局在を示すようになる。HIV Rev蛋白の核外移行シグナル配列(以下NES)を融合しdNLSを細胞質内へ規定すると、c-mycの発現誘導は局在を失ったものに比べ5倍ほど回復する。

以上の結果から、STAM-SH3会合分子の1つは脱ユビキチン化酵素UBPYであり、プロセッシングを受け、C-末端は核へと移行し脱ユビキチン化を行うことにより細胞増殖を抑制的に制御

していることが明らかとなった。

本研究において IL-2 の作用において蛋白の安定性という側面からの制御の重要性が明らかとなった。また一方、脱ユビキチン化酵素群のはっきりとした作用メカニズムが未だ不明であるなか、脱ユビキチン化酵素 UBPY は、STAM に会合し、核において酵素活性を発揮することによって、DNA 合成 c-myc の発現制御に関与するというはっきりとした作用の流れが明らかになったことは意義深いと言える。

審査結果の要旨

IL-2のシグナル伝達系においてDNA合成、c-mycの発現に関わる分子として、STAMが知られている。STAMのSH3欠損変異体の強発現は、IL-2刺激後のDNA合成を抑制する。このことから、STAM-SH3に会合する分子がIL-2のシグナル伝達系において、重要な役割を担っていると考えられていた。本論文は、脱ユビキチン化酵素UBPYがSTAM-SH3に会合し、IL-2の細胞増殖作用を抑制的に制御していることを明らかにしたものである。

本論文では、STAM-SH3のGST融合蛋白をプローブとしたFar-Western法によって会合分子を同定し、そのうちの一つUBPYについて解析を行っている。UBPYは一次構造から脱ユビキチン化酵素であることが予測され、実際に酵素活性を有することが確認された。発現は全ての臓器で確認され、細胞周期の進行と共に発現しG1期においてプロセッシングを受けた。IL-2刺激に伴うc-myc発現誘導、DNA合成誘導に対するUBPYの影響を検討した結果、N-末端領域を欠損させた変異体(以下UD3)の発現によって、DNA合成、c-myc発現誘導が抑制された。また、UD3発現誘導系を導入したBAF細胞では、UD3発現誘導下で酵素活性依存的に細胞増殖は抑制された。野生型UBPY(以下UBPY)とUD3の酵素活性には差がみられないが、細胞内での脱ユビキチン化能はUD3の方が強かった。また、UBPYは細胞質内に局在するのに対しUD3は核内に局在した。同様に、UBPYのプロセッシング産物について局在を検討すると、C-末端の断片のみが核分画において検出された。さらに、UD3の核移行シグナル欠損変異体(以下dNLS)およびHIV Rev蛋白の核外移行シグナル配列をdNLSに融合し局在を細胞質内へ規定した変異体を用いた実験から、UD3の抑制効果には核への局在が重要であることが示された。以上の結果から、STAM-SH3会合分子の一つは脱ユビキチン化酵素UBPYであり、UBPYはプロセッシングを受け、C-末端側断片は核内で標的分子の脱ユビキチン化を行うことにより細胞増殖を抑制的に制御することが考えられた。

近年、ユビキチン化-脱ユビキチン化を介した蛋白分子の量的・質的な制御系が種々の細胞機能の発現制御に重要であることが指摘されている。本研究は、IL-2による細胞増殖シグナル伝達機構において、脱ユビキチン化酵素が重要な役割を担っていることを初めて明らかにしたものである。本論文は、脱ユビキチン化によるサイトカインシグナル伝達制御の存在を明確に指摘した研究として、博士号授与に値する。