

Title	gp130シグナル伝達に関わるAPRFのクローニング
Author(s)	井上, 正宏
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39009">https://hdl.handle.net/11094/39009</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	井上正宏
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11812 号
学位授与年月日	平成 7 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科外科系専攻
学位論文名	gp130シグナル伝達に関わる APRF のクローニング
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 正  (副査) 教授 岸本 忠三 教授 高井 義美

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

血液, リンパ, 神経系の分化と増殖はサイトカインと呼ばれる様々な種類の液性因子によって制御されている。最近サイトカインレセプターの分子構造や活性化の機構が明らかにされつつあるが, その活性化を細胞応答に結び付けるシグナル伝達機構は未だほとんど理解されていない。APRF (acute phase response factor) は種々の急性期蛋白遺伝子のプロモーターに見られる IL 6 応答領域に結合する転写因子であり, IL 6 刺激で活性化され細胞質から核へ移行することが知られていた。本研究では APRF を精製して cDNA クローニングを行い, シグナルトランスデューサー gp130 を介するシグナル伝達での役割を検討した。

#### 【方法と結果】

##### 1. APRF の精製とクローニング

種々の時間で採取されたマウス肝臓の核抽出液で EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) を行ない, DNA 結合能の時間経過を解析した。プローブとしてラットの  $\alpha 2$ -マクログロブリン遺伝子プロモーター上の IL 6 応答領域を含むオリゴヌクレオチドを使用した。APRF の DNA 結合能は IL-6 静注後 5 分で最高値に達し 1 時間までに次第に減少した。さらにモノクロナル抗リン酸化チロシン抗体を加えると結合能がなくなることは, チロシン残基がリン酸化されていることを示している。次に APRF をコードする cDNA を単離するために APRF を精製した。IL-6 静注後 15 分のマウス肝臓の粗核抽出液を, DNA アフィニティーカラムを用いて精製し, SDS-PAGE で解析した。主要な要素である 95kd のバンドをゲルから切り出し, リジルエンドペプチターゼで消化して得られた一部のペプチドをアミノ酸シーケンスした。これらのペプチドをコードするデジェネレートオリゴヌクレオチドをプライマーにして, マウス肝臓の cDNA ライブラリーで PCR を行なった。さらに PCR 産物をプローブとして前記ライブラリーをスクリーニングし, 770 アミノ酸をコードする open reading frame を含む遺伝子を得た。

##### 2. APRF と STAT 1 $\alpha$ は類似している

APRF の cDNA シーケンスは既知の STAT 1  $\alpha$  (signal transducer and activator of transcription) と高い相同性 (アミノ酸で 52.5%) を持つことが明らかになった。また STAT 1  $\alpha$  と同様に SH 2, SH 3 ドメインを有し, 特に STAT 1  $\alpha$  と STAT 2 間で高度に保存された SH 2 ドメイン中のシーケンスは APRF でも完全に保存されていた。IFN- $\gamma$  や IFN- $\alpha$  などの刺激で STAT 1  $\alpha$  は 701 番目のチロシン残基がリン酸化されることが知られているが, APRF

の相当する場所にもチロシン残基が存在する。

### 3. APRF mRNA の組織分布

APRF をコードする mRNA の大きさと組織分布を調べるためにノザンブロットアッセイを行なった。APRF は単一の 4.8kb の mRNA にコードされており、その転写は心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、脾臓など種々のヒト組織で検出され、マウスの肝臓、脾臓、腎臓でも検出された。

### 4. APRF は IL-6 刺激で核抽出液中に形成される DNA 結合複合体の主要な要素である

クローニングした APRF が実際に APRF をコードしていることを確認するためにウサギを免疫してポリクロナル抗体を作成した。この抗体は精製した APRF とイムノブロットで反応し、分子量 95kd の蛋白を特異的に免疫沈降した。この抗体は p91 を免疫沈降もイムノブロットもしなかった。EMSA 反応に加えた場合、抗 APRF 抗体は IL-6 刺激したマウス肝臓の核抽出液と APRE 間の複合体の形成を阻害した。

### 5. APRF は gp130 を共有する他のサイトカイン刺激でもチロシンリン酸化を受ける

IL-6, LIF, OM, CNTF, IL-11 は、それらのレセプターがシグナルトランスデューサーである gp130 を共有するサイトカインのファミリーを形成している。肝細胞起源の HepG2 細胞とマウス骨髄前駆細胞起源の M1 細胞で IL-6 と同様に LIF, OM, CNTF も APRF をチロシンリン酸化した。以上より APRF は種々の細胞において gp130 を介したシグナルに反応してリン酸化され活性化されることが明らかになった。

#### 【総括】

インターフェロン刺激のシグナル伝達において、刺激に応じて既に細胞内に存在する因子 (STATs) のチロシン残基がリン酸化され、核へ移行して転写因子として働くという機構が知られている。クローニングした APRF は STAT1  $\alpha$  と高度のホモロジーを有し、STAT1  $\alpha$  と同様に刺激後チロシン残基がリン酸化されて細胞質から核へ移行した。すなわち APRF は STAT ファミリーに属する蛋白であることが明らかになった。APRF の転写は IL-6 のシグナルトランスデューサーである gp130 と同様に種々の組織で見られ、また APRF のチロシンリン酸化は、IL-6 の他に gp130 を共有する他のサイトカイン刺激でもみられた。これらのことから APRF 蛋白は gp130 を介したシグナル伝達に重要な役割をはたしていると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は gp130 シグナル伝達に関わる APRF 蛋白を精製し、cDNA クローニングを行なったものである。その結果 APRF は既知の ISGF 3 p91 と高い相同性を示しドメイン構造も保存されていることが明らかになった。インターフェロンのシグナルで、刺激後短時間のうちに細胞質でリン酸化を受け核へ移行し転写因子としての活性を持つ因子の存在が知られていた。APRF のクローニングによってインターフェロンのみならずサイトカインにもこの経路が存在し、これらの因子群が STAT (signal transducer and activator of transcription) ファミリーを形成していることが明らかになった。またサイトカインのシグナルで、ras 非依存性経路が存在することを実証し、さらに gp130 を介するシグナルにおいて APRF が普遍的に利用されていることも明らかにした。

以上の結果は gp130 を介するシグナルにとどまらず、サイトカインにおける細胞内シグナル伝達を明らかにする上で画期的なものとして評価され、学位に値する。