



Title	Transcriptional activation of the Interleukin-6 response element in the JunB promoter is mediated by multiple Stat family proteins.
Author(s)	藤谷, 与士夫
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39832
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	藤 谷 与 士 夫
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 7 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 8 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	Transcriptional activation of the Interleukin-6 response element in the <i>JunB</i> promoter is mediated by multiple Stat family proteins. (<i>JunB</i> 遺伝子プロモーター上の IL-6 応答領域を活性化するシグナルは複数の STAT 転写因子群によって伝達される)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 平野 俊夫 (副査) 教 授 辻本 賀英 教 授 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

IL-6 は免疫応答、造血あるいは炎症反応などを調節する多機能性のサイトカインである。IL-6 のこのような広範な機能はその標的細胞上に存在する IL-6 に特異的な受容体サブユニットである α 鎖 (p80) と、シグナル伝達にかかわる β 鎖 (gp130) からなる受容体複合体を介して発揮される。IL-6 の初期シグナルはその標的細胞において初期応答遺伝子である *junB* と *tis11* をすみやかに活性化する。申請者らは以前に *junB* 遺伝子プロモーター上に IL-6 応答領域 (JRE-IL6) を決定し、この領域が機能的に協調的に働く 2 つの DNA モチーフすなわち Ets 結合部位 (JEBS) と CRE 類似部位を含むことを示した。本論文では、申請者らが明らかにした IL-6 応答領域 JRE-IL6 にシグナルを伝えるしくみを明らかにするために、IL-6 刺激に伴って誘導される DNA 結合蛋白質の性状を解析するとともに、この精製をおこなった。

[方法ならびに成績]

まず最初に、ゲルシフトアッセイを用いて、IL-6 刺激で誘導され JRE-IL6 に結合してくる DNA 結合活性の有無を検討した。細胞は HepG2 を用い、プローブには、JRE-IL6 のうちの Ets 結合部位 (JEBS) と、もうひとつの IL-6 応答領域 (type II IL-6 応答領域) として知られる $\alpha 2$ -マクログロブリン遺伝子プロモーター上の APRE の 2 種類を用いた。IL-6 刺激を加えて 5 分という早期から誘導され、15 分で max を示し、60 分後に消失する DNA 結合活性が、JEBS、APRE どちらをプローブとした場合にも観察された。また、この結合活性はゲル上で同一の移動度を示した。次にこれらの DNA 結合活性の結合特異性を、各々のプローブをコンペティターとして用いることにより検討した。APRE ををプローブとして用いたときに IL6 刺激で出現する DNA 結合活性 APRF は、APRE をコンペティターとして用いたときにも、JEBS を用いたときにも非常によく結合阻害された。ところが JEBS の配列に点変異を加えた mJEBS では阻害されなかった。従って、APRF と JEBS に結合する活性は DNA 結合特異性において区別できないことが明らかとなった。以上、JRE-IL6 結合活性と APRF は、活性化の時間経過、ゲル上での移動度、および DNA 結合特異性の 3 点で共通であり、JRE-IL6 結合活性は APRF と同一であるかきわめて類似した活性であることが明らかとなった。

次に JRE-IL6 結合活性が APRF と同一であるかどうかを明らかにするために APRF を精製した。また、この精製蛋白質が APRE と JEBS に特異的に結合するかどうかを検討した。ラット腹腔内に IL-6 を投与し、

15分後に肝臓を摘出し、これより核蛋白質を抽出調整した。このラット300匹分に相当する核蛋白質をAPRF結合部位（APRE）の配列を用いてデザインしたDNAアフィニティクロマトグラフィーを3回、およびグリセロール濃度勾配法を1回用いることにより、結合蛋白質を完全精製した。精製された蛋白質はSDS-PAGEにて最も主要なものが89KD（pp89）に、その他マイナーなバンドが91KD（pp91）と85KD（pp85）に2本泳動された。またこれらは全てチロシンリン酸化された蛋白質であることがわかった。

さらにこのシグナル伝達路は先に明らかにされたIFNのシグナル伝達路と、JAKキナーゼを経由するなど類似点が見出されていたため、IFNによって活性化される転写因子STAT1（p91）と相同性をもつ新しいSTATファミリー蛋白質をコードする遺伝子をPCR法を用いてその一部をクローニングし、この遺伝子産物に対する抗体を作成した。精製されてきた最も主要な蛋白質pp89はこの抗体で強く確認された。また、pp85も本抗体で認識された。一方、pp91は α p91（ α STAT1）抗体で認識された。また、ゲルシフトアッセイを用いて精製されたAPRFはJEBに特異的に結合することも明らかとなった。

最後に最も主要な精製蛋白pp89 40 μ gを用いてマイクロシーケンス法によりそのアミノ酸配列を3箇所決定したところ、当時発表されたSTAT1（p91）と相同性をもつ新しいSTATファミリー蛋白質STAT3/APRFのアミノ酸配列にすべて含まれていることが明らかとなった。

〔総括〕

IL-6刺激に伴って、*JunB*のIL6応答領域（JRE-IL6）中のJEBに結合してくるDNA結合活性が存在することが明らかとなり、このものがIL-6のシグナルを細胞表面から核内へと伝達し、*JunB*プロモーターの活性化を引き起こす分子であると考えられた。このJEB結合活性はゲルシフト法を用いたAPRF活性との比較検討より、APRF活性と区別ができないことがわかり、JEBはAPRFの低親和性の結合部位であると推察した。

JEB結合活性の本体を同定するため、APRFの結合部位であるAPRFの配列に、IL-6刺激により誘導性に結合する蛋白質をラット肝臓より完全精製し、その最も主要な構成成分であるpp89の部分アミノ酸配列を決定した。

また精製と併行してPCR法を用いて、STAT1（p91）と相同性をもつ新しいSTATファミリー遺伝子のcDNAの一部をクローニングし、その遺伝子産物に対する抗体を作製した。

精製蛋白質はJEBにも特異的に結合し、電気泳動上、複数の蛋白質からなり、全てチロシンリン酸化をうけていることがわかった。さらに、これらは上記の抗体はあるいは抗STAT1抗体で認識されことより全てSTATファミリーに属する蛋白質群であることが判明した。そして最も主要な構成蛋白質pp89の部分アミノ酸配列は一足先にクローニングされたヒトおよびマウスSTAT3/APRFのものとすべて一致したことにより、pp89はラットSTAT3/APRFそのものであることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

細胞膜から核にいたるシグナル伝達路の解明は、外界からの刺激にตอบสนองして誘導される増殖や分化といった細胞機能発現のしくみを理解するうえで極めて重要である。本研究はInterleukin-6によって活性化される初期シグナル伝達路の解析を分子レベルで進めたものである。

IL-6の初期シグナルはその標的細胞において、初期応答遺伝子の一つである*JunB*遺伝子のプロモーター上のIL-6応答領域JRE-IL6に伝達される。JRE-IL6はEts結合部位とCRE類似部位により構成されており、両部位の存在がIL-6応答には必須である。本研究ではIL-6で誘導されるEts領域結合蛋白質の精製ならびに生化学的解析をおこなった。IL-6刺激で誘導されるEts領域結合蛋白質は、先に報告されていたIL-6誘導性のDNA結合活性APRFと、発現の時間経過やDNA結合特異性において区別できないことを示し、APRF結合領域はEts領域結合蛋白質の高親和性の結合部位であることを明らかにした。DNAアフィニティカラム等を用いてラット肝臓よりAPRFを完全精製するとともに、その部分アミノ酸配列を決定した。それと併行して、当時

すでに I F N のシグナル伝達にかかわることが明らかにされていた STAT 1 及び STAT 2 に相同性を有する新規な STAT 関連遺伝子を R T - P C R 法を用いて単離した。その遺伝子産物に対する特異抗体を用いることで、この新しい STAT 分子が、精製した A P R F の主要構成分子であることを明らかにした。また STAT 1 もマイナーな構成成分として含まれることも示した。最も主要な構成分子は、部分アミノ酸配列の決定および R T - P C R 法にてクローニングした新たな STAT 関連遺伝子の塩基配列より、ラットの STAT 3 であることが明らかとなった。

本研究によって I L - 6 の初期シグナルが STAT 3 と STAT 1 によって伝達されることが明らかとなり、そのシグナル伝達路の分子レベルでの解析の基盤を築いたといえる。今後これらの分子の挙動を解析することで、I L - 6 をはじめとする種々のサイトカイン群で誘導される諸々の生命現象のしくみが明らかにされてゆくものと考えられ、本研究の果たした役割は高く評価される。したがって学位論文に値するものと認められる。