The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

【27】

氏　　名	藤　谷　与士夫（ふじたに　よしお）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　12376　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 *JunB* promoter is mediated by multiple Stat family proteins. （*JunB*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（typeⅡ ＩＬ－６応答領域）として知られるα２－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αp91（αSTAT１）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ＪＥＢＳ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 40μｇを用いてマイクロシークエ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JEBS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ＪＥＢＳ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，ＪＥＢＳはＡＰＲＦの低親和性の結合部位であると推察した。

ＪＥＢＳ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ＪＥＢＳ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，外界からの刺激に応答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ＩＦＮのシグナル伝達にかかわることが明らかにされていたSTAT１及びSTAT２に相同性を有する新規なSTAT関連遺伝子をＲＴ－ＰＣＲ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ＡＰＲＦの主要構成分子であることを明らかにした。またSTAT１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ＲＴ－ＰＣＲ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STAT３であることが明らかとなった。

本研究によってＩＬ－６の初期シグナルがSTAT３とSTAT１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，ＩＬ－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。