

Title	Molecular mechanism of interferon- $\gamma$ dependent nuclear import of Stat1
Author(s)	関元, 敏博
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40793">https://hdl.handle.net/11094/40793</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 href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/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	関元敏博
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13676号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Molecular mechanism of interferon- $\gamma$ dependent nuclear import of Stat1. (インターフェロン- $\gamma$ の刺激に依存したStat1の核移行機構)
論文審査委員	(主査) 教授 米田 悦啓  (副査) 教授 高井 義美    教授 平野 俊夫

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

通常核内に存在して機能する蛋白質(核蛋白質)は細胞質のリボソーム上で合成されるとすみやかに核へ輸送される。われわれはこれまでに、核蛋白質を細胞質から核へ輸送する因子を同定してきた。しかしながら細胞内には通常細胞質に存在しており、何らかのシグナルがあって初めて核へ移行する蛋白質も少なくない。Statは成長ホルモンやサイトカインの刺激を細胞内の核に伝える転写因子で、通常は細胞質に存在しており、刺激に依存して核へ移行し、転写を活性化する。これまでの核移行の研究は恒常的に核へ輸送される因子が対象とされており、Statのようなシグナルに依存した核移行は、細胞内情報伝達機構の解明においても大変興味深い問題であるが、その機構は全くわかっていない。本研究では、Stat1のインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )の刺激に依存した核移行機構の分子レベルでの解明を目的とした。

#### 【方法ならびに成績】

##### 1) 材料の調製

クローニングしたヒトStat1の遺伝子を用いて、大腸菌からHA-tagをつけた組み換えStat1を調製した。Stat1の核移行は、組み換えStat1を動物細胞(Hela細胞)の細胞質にマイクロインジェクションすることで、IFN- $\gamma$ の刺激に依存的な核移行を抗HA抗体を用いた間接蛍光抗体法により観察した。核蛋白質の輸送に関わる因子(NPI-1, PTAC58, PTAC97, Ran)は、cDNAをクローニングしたのち大腸菌で発現させて精製した。各因子に特異的な抗体は、免疫したウサギの血清を用いて、各因子を結合させたアフィニティカラムにより精製を行った。

##### 2) チロシンリン酸化と核移行

Stat1はIFN- $\gamma$ の刺激に依存してチロシン残基(Y701)がJakキナーゼによってリン酸化されることが知られており、このチロシンをフェニルアラニンに置換すると核移行活性が失われた。またグルタミン酸に置換しても核移行活性が消失することから、単に負の電荷が存在するだけではなくチロシンのリン酸化が核移行に必須であることが判明した。

##### 3) Stat1を認識する因子

これまでに、核蛋白質は細胞質において、その核移行シグナル(NLS)を認識するNLS受容体と核膜孔に結合する

活性をもつ PTAC97 との 3 者で複合体を形成することが明らかにされている。核蛋白質を核へ輸送する因子群が Stat 1 のシグナルに依存した核移行に関与するかどうかを検討するために、これらの因子をグルタチオン S トラंसフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として調製し、Hela 細胞の全細胞抽出液を用いて pull down 実験を行った。PTAC97 は何らかの細胞質性因子の存在下においてのみ Stat 1 と相互作用することがわかった。また、これまでに同定されたヒトの NLS 受容体は大きく 2 つのグループ (Rch1 ファミリーと NPI-1 ファミリー) に分けられるが、このうち NPI-1 のみがチロシンリン酸化した Stat 1 と相互作用することが明らかとなった。つづいて、これらの因子に対する特異抗体を調製し動物細胞の細胞質にインジェクションすると、NPI-1 や PTAC97 に対する抗体は Stat 1 のシグナル依存的な核移行を非常に強く阻害したのに対して、Rch1 (=PTAC58) に対する抗体は全く影響を与えなかった。このことから、実際の細胞内で NPI-1 と PTAC97 が Stat 1 を細胞質から核へ輸送していると考えられた。さらに NPI-1 はどのようにして Stat 1 を認識しているのかを検討するために、NPI-1 の deletion mutant を作製し、Stat 1 との結合活性を調べた。通常の核移行シグナルを持つ蛋白質は NPI-1 のアルマジロ構造と呼ばれる部位に結合するのにに対して、Stat 1 は NPI-1 のカルボキシル末端領域に結合し、両者の NPI-1 上の結合部位は明らかに異なっていた。また、核移行シグナルをもつ蛋白質を加えると、核蛋白質と NPI-1 の結合は強く阻害されるのに対して、Stat 1 と NPI-1 の結合は全く影響を受けないことから、NPI-1 には少なくとも 2 カ所の輸送蛋白質結合領域があり、同時に 2 つの蛋白質を結合することが出来るものと考えられる。

#### 4) 低分子量 G 蛋白質 Ran の関与

Ran は核蛋白質の核内移行に関与していることが明らかにされているが、Ran 特異的な抗体を調製し、動物細胞の細胞質にインジェクションすると Stat 1 の核移行が強く阻害された。そこで、GTP の結合や GTP の加水分解活性に影響を与えるような変異 (それぞれ T24→N および G19→V) を Ran に導入すると、いずれの変異体でも Stat 1 の核移行が阻害された。このことから、Ran の GTP 加水分解活性が Stat 1 の核移行に必須であり、Ran は通常の核蛋白質のみならず、Stat 1 の細胞外シグナルに依存した核移行にも重要な役割を担っているといえる。

#### 【総括】

本研究において、Stat 1 は IFN- $\gamma$  の刺激に依存してチロシンリン酸化され、NPI-1、PTAC97、Ran によって核へ輸送されることを明らかにした。特に、2 つに分けられる NLS 受容体のうちの一つのグループ (NPI-1) のみが Stat 1 を認識し、その Stat 1 結合領域は通常の核蛋白質結合部位と異なっている証拠を初めて提示した。これらのことから、通常の核蛋白質と Stat 1 の核移行機構は、受容体による分子の認識の段階が異なっているといえる。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、細胞外刺激に対応した蛋白質の細胞質から核内への移行の分子メカニズムを明らかにするために、免疫応答等に重要な役割を担っている Stat に着目し、Stat 1 のインターフェロン- $\gamma$  の刺激に依存した核内移行機構を検討したものである。その結果、Stat 1 の核移行にはチロシンリン酸化が必須であり、大きく 2 つのグループに分けられる核移行シグナル受容体のうち NPI-1 を含むグループのみが、チロシンリン酸化した Stat 1 を認識することを明らかにした。また NPI-1 における Stat 1 と通常の核蛋白質の結合部位が異なっており、2 つの蛋白質が同時に核へ運ばれる可能性を示した。さらに低分子量 G 蛋白質である Ran が通常の核蛋白質のみならず、Stat 1 のシグナル依存的な核移行にも重要な役割を担っていることを明らかにした。

以上のように、本研究は Stat 1 のインターフェロン- $\gamma$  に依存した核内移行経路を明らかにしたものであり、蛋白質の核内移行機構の研究のみならず、Stat 1 の細胞内情報伝達機構の研究においても極めて重要な知見をもたらした。したがって、本研究は学位授与に値する。