Osaka University Knowledge Archive

Title	Molecular mechanism of interferon-γ dependent nuclear import of Statl
Author(s)	関元, 敏博
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40793
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【3】

氏　　名	関　元　敏　博（せき もと とし ひろ）
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-γ dependent nuclear import of StatI. （インターフェロン－γの刺激に依存したStatI 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）は細胞質のリボゾ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，Stat 1 のインターフェロン－γ（IFN-γ）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 Stat 1 の遺伝子を用いて，大腸菌から HA-tag をつけた組み換え Stat 1 を調製した。Stat 1 の核移行は，組み換え Stat 1 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-γ 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ー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

Stat 1 は IFN-γ 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）Stat 1 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トランスフェラーゼ（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（Rch 1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-γ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-γ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-γ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。