Osaka University Knowledge Archive

Title	Autoregulation of the Stat3 Gene through Cooperation with a cAMP - responsive Element-binding Protein
Author(s)	市場, 誠
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41725
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

氏　　名	市場　誠（いちば　まこと）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　14491　号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	Autoregulation of the Stat3 Gene through Cooperation with a cAMP－responsive Element-binding Protein. （Stat3はCRE結合蛋白と複合体を形成することにより自己の転写活性を調節している。）
論文審査委員	（主査） 教　授　松澤　佑次 （副査） 教　授　平野　俊夫　　教　授　金倉　　譲

論文内容の要旨

【目的】

Signal Transducer and Activator of Transcription3（Stat3）はIL－6シグナルを伝達する重要な転写活性化因子で，その下流では細胞の生存，増殖，分化にかかわる遺伝子や急性期反応蛋白の遺伝子が発現誘導される。これまでの研究によって，マウス白血病細胞株M1では，IL－6刺激によりStat3は持続的にリン酸化され，またStat3蛋白の発現量も増加することが明らかとなった。本研究では，このStat3蛋白発現増強にかかわる，IL－6シグナルによるStat3遺伝子の発現調節機構の解析を目的とした。

【方法ならびに成績】

M1細胞及びヒト肝ガン細胞株HepG2細胞においてIL－6刺激によるStat3のmRNAの誘導について検討した。両細胞においてIL－6刺激1時間でStat3mRNAの誘導が認められ6時間以上持続した。新たな蛋白合成を阻害するためcyclohexamideで前処置をしてからIL－6刺激しても，前処置をしなかったものと同様に刺激1時間でStat3mRNAの誘導が認められた。このStat3mRNAの発現誘導のシグナルがgp130の細胞内ドメインのどの部位から出ているかを解析するために，GHレセプターとgp130のキメラレセプターをM1細胞に恒常的に発現させた細胞株を用いてStat3mRNAの発現を検討したところ，gp130細胞内ドメインの108番から133番目までのアミノ酸，特にStat3活性化にかかわる126番目のチロシン（Y3）が必要であることがわかった。

次にマウスのgenomic libraryよりPCRを用いて2166bpのマウスStat3プロモーターを得，種々の5'上流を欠失させたプロモーターレポーター遺伝子を作成しルシフェラーゼアッセイを用いてIL－6応答領域を同定した。このIL－6応答領域はTGCCAGGAAという非典型的なStat3結合部位とその5bp上流のTGACGTCAという典型的なcAMP responsive element（CRE）とからなり，いずれの部位に変異を導入しても転写活性の減弱が認められた。

このIL－6応答領域を含むオリゴヌクレオチドをプローブとしてMH60cellの核蛋白を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ，IL－6刺激により速やかに誘導される複合体を認めた。この複合体は，①抗Stat3抗体によりsuper siftすること，②c－Jun，CREB，ATF2，ATF3，ATF4といった既知のCREに結合する転写因子の抗体ではsuper siftしなかったこと，③Stat3結合部位を含むオリゴヌクレオチドやCREを含むオリゴヌクレオチド単独により複合体形成が競合阻害されること，④Stat3結合部位やCREいずれかに変異を導入したオリゴヌクレオチドをプ

ローブとしたときには複合体が認められないことより，Stat3と未知のCRE結合蛋白の複合体であると考えられた。

【総括】

以上の結果よりStat3は未知のCRE結合蛋白と複合体を形成することにより自己の転写活性を正に調節していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は，IL－6の重要な転写活性化因子であるSignal Transducer and Activator of Transcription3（Stat3）の発現調節機構の解析を行ったものである。マウスのgenomic libraryより約2.2kbのStat3プロモーターをとり，その塩基配列を解析した。ルシフェラーゼアッセイ，ゲルシフトアッセイにてStat3はStat3遺伝子プロモーター上の－335から－314に位置するIL－6応答領域を介して自己の転写活性化を促進すること，このIL－6応答領域はlow affinityのStat3 Binding Element（SBE）とcAMP－responsive Element（CRE）からなり，Stat3のホモダイマーと未知のCRE結合蛋白が複合体を形成して結合することを明らかにした。Stat3が増殖停止，分化誘導に重要な役割を果たしているマウス白血病細胞株M1ではStat3活性の持続が認められ，この活性の持続にも一部関与すると考えられるStat3遺伝子発現調節の仕組みを明らかにしたことは，IL－6シグナルによる細胞の生存，増殖，分化の仕組みを解析する上で極めて意義深い。また，Stat3ノックアウトマウスは胎児期死亡のため，Stat3遺伝子プロモーター上のIL－6応答領域に変異を導入したマウスを作成することは，免疫系をはじめ広範な組織でのStat3の機能解析を可能とする重要なモデルになると考えられ，今後の発展性にも期待できるものがある。よって本研究は学位の授与に値する論文と考えられる。