



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41725">https://hdl.handle.net/11094/41725</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">大阪大学の博士論文について</a>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	いちば まこと 市 場 誠
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 9 1 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 Stat3 mRNA 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 Stat3 mRNA の誘導が認められた。この Stat3 mRNA 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 Stat3 mRNA 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 5 bp 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 MH60 cell 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、③ Stat3 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、④ Stat3 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ブ

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。