

Title	Regulation of Pim-1 by Hsp90
Author(s)	水野, 克典
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42677">https://hdl.handle.net/11094/42677</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	水野克典
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16123 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Regulation of Pim-1 by Hsp90 (Hsp90による Pim-1 の制御機能の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 平野 俊夫  (副査) 教授 菊谷 仁 教授 宮坂 昌之

## 論文内容の要旨

## 【目的】

gp130は、IL-6ファミリーサイトカイン受容体の共通のサブユニットである。サイトカイン刺激により、gp130は会合するチロシンキナーゼ JAK によりリン酸化され、さらにリン酸化 gp130は SH2 ドメインを有するシグナル伝達分子 STAT3 や SHP-2 をリクルートし活性化する。マウス proB 細胞 BAF-B03及び gp130を含むキメラ受容体を用いた解析から、gp130を介する増殖シグナルにおいて、STAT3 を介するシグナルが細胞周期 G1/S 移行と細胞死抑制に関与していることが明らかとなっている。さらに、STAT3 を介するシグナルの下流に、プロトオンコジーン *Pim-1* (セリン/スレオニンキナーゼ)、*c-myc* が存在し、*Pim* ファミリー遺伝子と *c-myc* が協調的に G1/S 移行・細胞死抑制を制御していること、*Pim-1* の下流に位置する遺伝子の一つとして *VCP (cdc48p)* が明らかとなっている。*Pim-1* はリンパ腫のプロトオンコジーンとして単離されたが、その作用機構や *Pim-1* から *VCP* にいたるまでの細胞内シグナル伝達経路は明らかにされていない。そこで、*Pim-1* の機能を明らかにすることを目的とした。

## 【方法ならびに成績】

1. *Pim-1* 会合タンパク質 (*Hsp90 α/β*) の単離と同定

*Pim-1* に会合する分子の探索を試みた。マウス proB 細胞 BAF-B03に gp130を含むキメラ受容体を発現させた細胞株 (BAF-G133) に Myc タグを付加した野生型の *Pim-1* と活性不活型の *Pim-1* をドキシサイクリン (DOX) で誘導発現できる細胞株 (G133-*Pim-1* DOX と G133-K67MPim-1 DOX) を用いて以下の実験を行った。この細胞を [<sup>35</sup>S] メチオニンで代謝標識した後、DOX 処理により誘導した Myc タグ付き *Pim-1* を、抗 Myc タグ抗体を用いて免疫沈降を行った結果、*Pim-1* に会合する約90kDa の蛋白質を検出した。この蛋白を 1 × 10<sup>10</sup>個の G133-K67MPim-1 DOX より精製し SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜に転写した。この90kDa 分子を切り出し、LysC ペプチダーゼで分解した後、MALDI-TOF Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) で分析し、ペプチド断片の質量を測定した。このデータとデータベース上の蛋白データを MS-Fit プログラムを用いて比較し、13個のペプチドが *Hsp90 α* に11個のペプチドが *Hsp90 β* 由来のペプチドと一致した。さらに G133-*Pim-1* DOX 及び G133-K67MPim-1 DOX から Myc-*Pim-1* を抗 Myc タグ抗体で免疫沈降し、共沈してくる90kDa 蛋白が抗 *Hsp90 (α/β)* 抗体と反応することから、*Pim-1* と *Hsp90 (α/β)* が細胞内で会合することが示された。*Hsp90* と *Pim-1* の会合領域を決定するために *Hsp90 β* と *α* の様々な領域の変異体を構築し、ヒト胎児腎臓

細胞由来の293T細胞に遺伝子導入して免疫沈降法で検討した。その結果Pim-1は、Hsp90 $\alpha$ 、 $\beta$ に会合し、Hsp90C末の550-578番目の28アミノ酸が会合に重要であることが示唆された。

2. Hsp90 $\alpha$ は、gp130依存的に活性化されるSTAT3シグナルによって制御される。

Hsp90は、細胞内に豊富に存在する分子で、ストレスを含む様々な刺激により発現誘導される。近年、IL-6の刺激によりHsp90 $\beta$ の発現が制御されうると報告されており、我々は、gp130のどのシグナルより発現制御されうのかを詳細に検討するためgp130の細胞内領域の様々な変異体を導入した細胞株を用いてNorthernプロット解析を行った。gp130刺激により、Hsp90 $\alpha$ の発現量の上昇が見られた。また、その発現は、SHP-2/Ras/MAPK経路の活性化に重要なチロシン残基をフェニルアラニンに置換した細胞株(G133F2)では、発現量の変化が見られなかったが、STAT3の活性化に重要なチロシン残基をフェニルアラニンに置換した細胞株(G133F3)においては、gp130の刺激によるHsp90 $\alpha$ の発現が減弱していた。さらにシクロヘキシミド前処理により発現が阻害されたことより、gp130依存的なSTAT3シグナルから生じる蛋白質のdenovo合成を介して発現制御されることが示唆された。

3. Hsp90は、Pim-1の安定性と機能に重要である。

Hsp90がPim-1に対してどのように働くのかを検討するためにHsp90の機能を特異的に阻害する阻害剤geldanamycin(GA)を添加し、Pim-1を含む様々な蛋白質をWesternプロット法にて検出した。GA添加により、Hsp90と相互作用に関係ないERK2やSTAT3のタンパク質の量に影響が見られなかった。一方、Hsp90の相互作用が報告されているRaf-1と同様にPim-1の著しい減少が認められた。ここで見られた蛋白質の減少が合成から分解にいたるどの過程で、作用しているかを検討した。蛋白質量は、 $^{35}\text{S}$ メチオニン代謝標識したPim-1蛋白質を免疫沈降にて、RNA量はNorthernプロット法にて比較検討した。その結果、蛋白質、mRNA量共に変化は見られなかった。次に、蛋白質の安定性を検討するため、パルスチェイス標識を行った。GA処理したサンプルは、無処理のサンプルよりもPim-1蛋白質の分解される速度が優位に早まっていた。以上のことからHsp90は、Pim-1蛋白質の安定性に重要であることが示唆された。このPim-1蛋白質の安定性が下流のシグナル伝達に及ぼす影響を検討するために、GA処理し、Pim-1のリン酸化酵素活性をHistone H1を基質にしたin vitro kinase assayにて解析を行った。GA処理によりPim-1の酵素活性が有意に減弱していた。

#### 【総括】

以上の結果より、Hsp90 $\alpha$ とPim-1は、gp130の活性化により生じるSTAT3シグナルの活性化を介し発現制御され、合成されたPim-1は、Hsp90のC末(550-578)の28アミノ酸残基を介してPim-1と会合してPim-1の機能を保持するために安定化させていることが示唆された。このことは、サイトカイン依存性細胞増殖や白血病・リンパ腫発症でみられるPim-1の生物学的役割を理解する上で重要である。

### 論文審査の結果の要旨

Pim-1は、セリン/スレオニンキナーゼをコードするプロトオンコジンであり、サイトカイン依存性の細胞増殖やレトロウイルスの感染によって生じるリンパ腫に関与することが明らかとなっている。しかし、どのようにしてPim-1からのシグナルが伝達され、機能するかは明らかにされていない。そこで、Pim-1からのシグナルを詳細に解析することを目的とし、Pim-1に会合する分子の単離を試みた。 $^{35}\text{S}$ メチオニン代謝標識した後、免疫沈降法にてPim-1とともに共沈してくる90kDaの蛋白質を検出した。この蛋白質をプロテオーム解析した結果、Hsp90 $\alpha$ と $\beta$ の二つのアイソフォームであることを明らかにした。またHsp90 $\alpha$ は、Pim-1と同様にSTAT3経路からのシグナルにより発現制御されることを明らかにした。Hsp90の特異的な阻害剤を用いた実験において、Pim-1の分解が促進され、Pim-1の蛋白質量に影響されない条件下においても、Pim-1のキナーゼ活性が抑制されていた。これらの結果から、STAT3経路を介し発現制御されたHsp90は、Pim-1の蛋白質が機能する上で重要な安定性に関与していることを明らかにした。これらは、サイトカイン依存性細胞増殖や白血病・リンパ腫発症でみられるPim-1の生物学的役割や、Pim-1における腫瘍化のメカニズムを理解する上で重要である。よって、この研究における成果は、博士(医学)の学位に値するものと認める。