

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08639

研究課題名(和文)核内STAT3運命決定シグナルの同定

研究課題名(英文)Fate determination of nuclear STAT3

研究代表者

中嶋 弘一 (Nakajima, Koichi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00227787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：STAT3のpS727はV77L78を介したNTD間の相互作用とともに非活性化過程を開始し、結果としてpY705脱リン酸化とCRM1非依存的核外輸送をもたらした。N末タグの付加により、STAT3はCRM1依存的に核外輸送されるようになったことから、非活性化過程に何らかのコンフォメーション変化が存在することを示した。pY705-SH2結合を詳細に検討した結果、L706-P715領域CTTが、自らのSH2との結合、相手のCTTとの結合を通じてpY705-SH2結合を制御することを見出した。pS727はP715依存的なCTTの何らかの修飾を介して、pY705-SH2結合を弱めるという機序を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いずれのSTATファミリーも活性化-非活性化サイクルを行うことで正しく細胞内シグナルを受容し、遺伝子発現制御を行っている。このSTAT 活性化-非活性化サイクルの実体を明らかにし、制御系を知ることが、生理的意味を知るだけでなく、治療法開発に重要である。申請者らのSTAT3研究で、この活性化-非活性化サイクルがpS727リン酸化、NTD相互作用、コンフォメーション変化、CRM1非依存的核外輸送系などにより制御されることがわかってきた。さらなる研究のもと効果的な制御方開発を進める基盤ができたきたと考えている。

研究成果の概要(英文)：STAT3 pY705 stabilizes STAT3 dimer with reciprocal pY705-SH2 interaction and pS727 accelerates pY705 dephosphorylation. We studied how pS727 regulates STAT3 in both structural and biological perspectives. Using reconstituted STAT3 in HepG2, we showed that pS727, together with a hand-shake NTD interaction, causes rapid inactivation of STAT3 for pY705 dephosphorylation and a CRM1-independent nuclear export. Various N-terminal tags rendered the export CRM1-dependent, suggesting the importance of conformational changes in inactivation. The detailed analysis of the pY705-SH2 structure identified the C-terminal-tail (CTT) from L706 to P715 as a key regulator for the CTT-CTT intermolecular and the CTT-SH2 intramolecular interactions that support pY705-SH2 association. Importantly, Pro715 was critical for the pS727's destabilizing activity. Thus, pS727 triggers pY705-SH2 dissociation by weakening the supportive interactions likely through CTT modulation for proper function of STAT3.

研究分野：免疫学

キーワード：STAT3 pY705-SH2 構造 pS727 コンフォメーション変化 核外輸送系

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外からの刺激への応答は、多くは細胞内シグナルにより活性化される転写因子群を介した遺伝子発現という形で現れる。IL-6などのサイトカインではJAK-STAT経路を中心に、活性化されたシグナルの多様性、強さ、持続、クロストークなどでその作用が決まる。従って、人為的な制御技術開発にもシグナルで活性化された転写因子の核内動態の理解が重要である。STAT3は非刺激条件でも細胞質と核間を行き来し、活性化されたJAKキナーゼによりY705にリン酸化を受けるとSTAT3は互いのSH2が相手のpY705と結合し平行2量体を形成し、ある時間核内にとどまることで遺伝子発現を引き起こす。STAT3核内蓄積は活性化STAT3の核移行の亢進によるのではなく、核外輸送の低下によると考えられている。実際の核内蓄積制御機序は全く不明である。我々は、STAT3活性に作用のあるSer727リン酸化に関し、IL-6刺激後、STAT3と複合体を形成しながらSTAT3Ser727リン酸化をもたらすTAK1-NLKキナーゼ経路を同定し(Kojimaら、Proc Natl Acad Sci. 2005)、このSer727リン酸化がTC45チロシン脱リン酸化酵素TC45(Stat1やStat3の主たる核内PTPase)による核内でのpY705脱リン酸化を促進することで、STAT3の活性持続を短時間にすることを報告していた(Wakaharaら、Genes Cells 2012)。

2. 研究の目的

STAT3の核内蓄積の制御機序と非活性化過程と核外輸送系までの制御系を明らかにすること、新規モデルを提示することを目的とした。また制御系に関わる実体を追求し、核外輸送系の検出系を開発することを目的とした。この過程で新規制御系を標的とした阻害分子探索法を見出すことも目標とした。非活性化を抑制するキナーゼの存在についても検討する。

3. 研究の方法

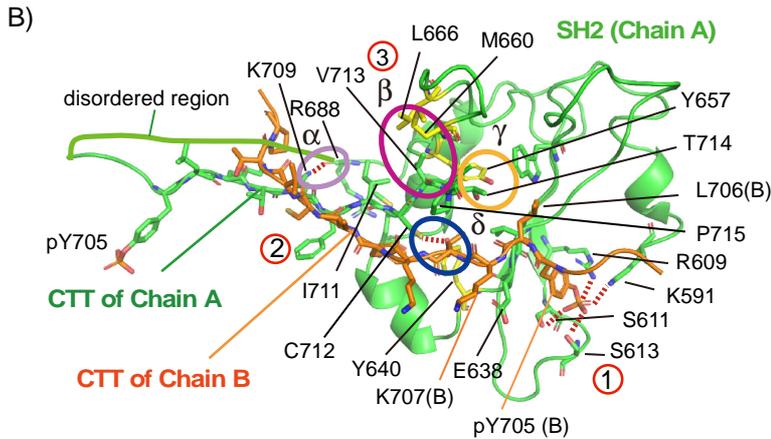
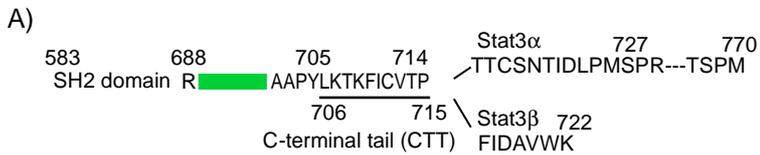
HepG2細胞でStat3遺伝子をノックアウトしたHepG2-Stat3KO(SKO)とさらにTC45をノックアウトしたHepG2-double KO(DKO)細胞株に種々のStat3変異体を一定レベルになるように発現させた細胞株を用いた。様々な変異型STAT3の非活性化の指標として、IL-6刺激で得られたpY705の脱リン酸化と刺激前後のSTAT3の局在変化、核外輸送を用いた。非活性化経路の最初に起こるステップが、pY705-SH2相互作用の解離であり、その解離がpS727依存的に起こると考え、構造解析を行った。STAT3の非活性化変異体や活性型変異体がどのようにpY705-SH2相互作用の解離や安定化に影響を与えるのか、実際の非活性化に与える効果と構造上の作用機序を検討した。構造解析には、結晶構造1BG1.pdbをもとにProtein interaction calculator (PIC)を用いて分子内および分子間の相互作用を解析した。CRM1依存的核外系はCRM1阻害剤LMBにより抑制を受ける。実際LMBは投与後15分程度でCRM1依存的な核外輸送抑制することが確認できたため、IL-6刺激15分前に投与することでCRM1依存的核外輸送の関与を検討した。N末ドメイン間の結合が非活性化過程の開始に関わるなどコンフォメーション変化の意味を検討した。

4. 研究成果

(1)まず活性化に伴い核内に貯留したSTAT3が非活性化されるが、非活性化過程がどのようなものであるのかを検討し、pY705脱リン酸化と核外輸送は非活性化の結果起こる事象であるが、全く独立したものであることを見出した。その上でpS727依存的に起こる非活性化過程を検討した。pS727はハンドシェイク型のNTD間相互作用とともにpY705脱リン酸化と主にCRM1非依存的な核外輸送を引き起こすきっかけを与えるものとの理解を得た。

(2)STAT3のN末にGFP関連RubyやFLAGペプチドを付加すると、チロシン脱リン酸化はむしろ促進されるが核外輸送が遅れかつCRM1依存的輸送系を用いるようになることを見出した。このことからN末ドメインの関係した何らかのコンフォメーション変化がチロシン脱リン酸化の受けやすさや核外輸送系の選択に関わる可能性を示した。

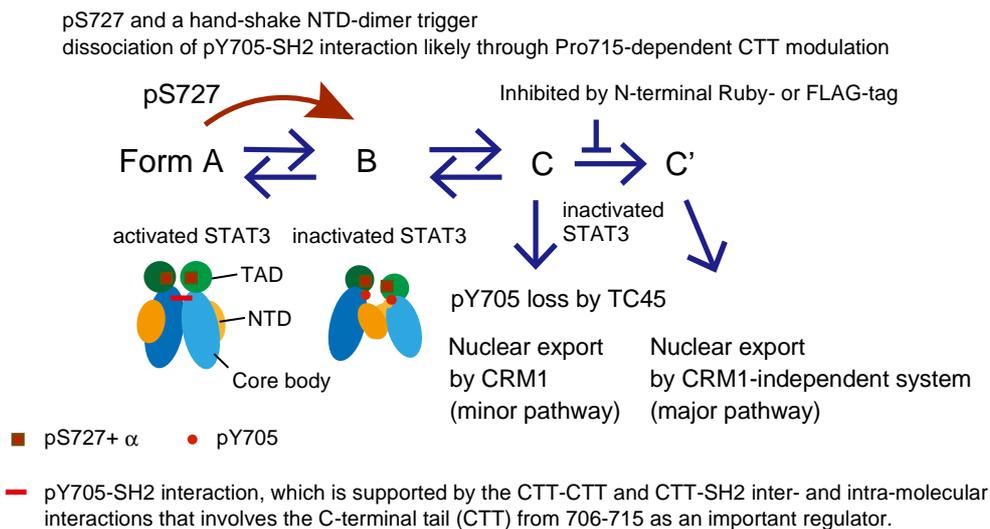
(3)活性型STAT3はpY705が相手分子のSH2に認識されることで平行型ダイマーを形成している。従ってpY705-SH2結合の起こり方、制御を知ることが重要である。そこでpY705-SH2結合に関わる構造を詳細に検討したところ、pY705-SH2相互作用は、次の3層の相互作用からなることがわかった。STAT3SH2のR688からS701付近は結晶構造で位置の決まらない部分があり、その後のY705を含むペプチド領域が相互作用に関わっていると考えられた。特にL706からT714の領域(C-terminal tail, CTTと命名)にはSTAT3非活性化をもたらす変異が集中しており、このCTTの意味を探った。CTTは自らのSH2ドメインと結合するだけでなく、互いのCTT間でも相互作用があり、これらCTT-SH2(図中の○)、CTT-CTT結合(図中の△)がpY705-SH2の相互作用(図中の□)を支持する役割を持つと判明した。実際に非活性化をもたらすSTAT3変異(K709E, T714A, T708Sなど)は、CTT-SH2間やCTT-CTT間の相互作用を弱める作用をもち、SH2ドメイン内に見られる活性型変異体(Y640F, K658Y, D661Vなど)は、CTT-SH2間の相互作用を強めることでpY705-SH2結合を安定化させることを示した。



(4)pS727 依存的な非活性化促進作用は、pS727 依存的に起こるのであろう CTT 部の修飾が CTT-SH2 相互作用を弱めることに由来すると考えた。想定した修飾は、K707, K709 のアセチル化、T714, T708 のリン酸化であるが、P715A という変異が pS727 の非活性化作用を無くしてしまう効果を持つことから、pS727 作用には P715 が必要であることから、pS727 の作用は P715 依存的な CTT の何らかの修飾を通じて起こすと考えられた。

(5)pS727 依存的な非活性化の促進により、活性化 STAT3 の非活性化 (pY705 脱リン酸化と速やかな核外輸送) が速やかに起こるようになり、なお残存するキナーゼ活性による活性化を受けることで繰り返し活性化され *saa1* などの遺伝子発現が持続的に起こるものと理解できた。

この研究成果に基づくモデルを提示する。



Rapid cycles of STAT3 activation-inactivation de termines the STAT3 activity.

pT705-SH2 結合の詳細な構造をもとに阻害剤の標的を求める方法について特許申請を行った。これらの結果は、なおも未知のコンフォメーション変化が関わっていること、N 末ドメインの相互作用がもっと複雑に制御に関わること、未知のキナーゼによる制御が存在すること、CRM1 非依存的核外輸送系が重要な役割をすることなど今後の研究に向けた大きなヒントを得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yang Junhao, Kunimoto Hiroyuki, Katayama Jumpei, Zhao Hong, Shiromizu Takashi, Wang Lingyu, Ozawa Toshiyuki, Tomonaga Takeshi, Tsuruta Daisuke, Nakajima Koichi	4. 巻 32
2. 論文標題 Phospho-Ser727 triggers a multistep inactivation of STAT3 by rapid dissociation of pY705-SH2 through C-terminal tail modulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 73-88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yang Junhao, Kunimoto Hiroyuki, Zhao Hong, Wang Lingyu, Nakajima Koichi
2. 発表標題 Dissociation of STAT3 C-terminal tail from its own SH2 is critical for phosphoSer727-dependent STAT3 inactivation
3. 学会等名 日本免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yang Junhao, Kunimoto Hiroyuki, Katayama Bumpei, Wang Lingyu, Zhao Hong, Ozawa Toshiyuki, Tsuruta Daisuke, Nakajima Koichi
2. 発表標題 Fate decision of activated STAT3 for nuclear accumulation or export through regulated multiple conformational changes.
3. 学会等名 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wang Lingyu, Zhao Hong, Yang Junhao, Kunimoto Hiroyui, Nakajima Koichi
2. 発表標題 Tetramer-based model of STAT3 activation-inactivation
3. 学会等名 日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 S T A T 3 非活性化促進化合物及びそのスクリーニング方法	発明者 中嶋 弘一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-076400	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	趙 虹 (Zhao Hong) (10596183)	大阪市立大学・大学院医学研究科・特任講師 (24402)	
研究 分 担 者	國本 浩之 (Kunimoto Hiroyuki) (80372853)	大阪市立大学・大学院医学研究科・助教 (24402)	