

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590317

研究課題名（和文）STAT3 複合体とキナーゼによる転写伸長制御機序の解明と応用

研究課題名（英文）Study on the mechanisms of STAT3-dependent transcriptional elongation

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

研究成果の概要（和文）：STAT3 による標的遺伝子群の発現機序、とくに転写伸長過程を制御する分子群と関与するキナーゼの特定と STAT3 Ser727 リン酸化の役割を解析した。その結果 (1) STAT3 依存的転写伸長時には、CDK9 のほか、ELL2 や AFF4 を含む超伸長複合体 (SEC)、CDK12, CDK13 が標的遺伝子プロモーターおよび遺伝子上にリクルートされることを明らかにした。超伸長複合体の必要度は標的遺伝子により異なっていた。(2) STAT3 Ser727 リン酸化が、これまで知られる転写活性の増強作用に加えて、核内のチロシン脱リン酸化酵素 TC45 を通じて pY705 チロシンの脱リン酸化を促進することで、STAT3 活性の持続を短くするという新規役割を見いだした。

研究成果の概要（英文）：We studied 1) the mechanisms of STAT3-dependent transcriptional activation of its target genes, especially at the elongation level and 2) the role of the STAT3 Ser727 phosphorylation in the gene regulation. We found that STAT3 recruits CDK9, CDK12 and CDK13 as well as super elongation complex (SEC) to its target genes including *socs3* gene promoter and 3' ORF. It is likely that multiple Pol II CTD kinases are involved in the STAT3-regulated gene elongation. The role of SEC seemed to vary depending on the target genes. We found that phosphorylation of Ser727 of STAT3 determines the duration of STAT3 activity largely through nuclear protein tyrosine phosphatase TC45.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：STAT3 転写伸長 キナーゼ チロシンフォスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 転写伸長過程の制御には不明なことが多く、pTEFb を構成する CDK9 の活性だけでは説明できないことから、複数のキナーゼが関与する可能性が考えられた。

(2) STAT3 の修飾とくに Ser727 リン酸化の役割が不明であった。このリン酸化が STAT3 による転写の開始もしくは伸長過程に役割を持つ可能性が示唆されていたが、詳細は明らかでない。

かではなかった。また STAT3 と複合体を形成する分子群の存在や役割についても解明すべき点が多かった。

(3) *c-fos* 遺伝子発現においては、ERK1/2 活性と STAT3 活性の間で協調的に転写が活性化されるが、この協調作用が転写開始よりも伸長レベルで起こるといふ仮説を申請者は持っていた。

2. 研究の目的

以上のことをふまえ、次の三つの問題に答えを見いだすべく研究を行う。

(1) STAT3 による標的遺伝子の転写伸長過程制御に関わる分子群の同定と役割を明らかにすること。

(2) Pol II CTD Ser2 リン酸化を制御するキナーゼとしては CDK9 単独では説明できないことから、可能性のあるキナーゼを見だし、役割を明らかにすること。

(3) STAT3 の修飾のうち、Ser727 リン酸化の役割を分子機序とともに明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) biotin-DNA 上に活性化した STAT3 とその上に形成される複合体を LC-MS/MS を用いたプロテオミクス技法を用いて解析し、STAT3 依存的転写に関与する分子群を探索する。この実験には、N 末に TAP-tag を付加した STAT3 発現細胞を用いることでより安定的な複合体を得ることを試みる。この方法では、当初、種々の DNA 結合性転写因子に加え、様々な複合体が回収されてきたが、用いた DNA 配列に問題があり、多くのアーティファクトが回収され、改良を試みたが、再現良く複合体を回収するに至らず、中断せざるを得なかった。

(2) 転写伸長に関与する分子群、CDK9, CDK12, CDK13, Mediator を構成する分子群、Super elongation Complex を構成する分子群のうち AFF4 と ELL2 については、cDNA を入手、もしくは RT-PCR にて得た。必要なものには、Tag を付加した発現ベクターとし、細胞に安定に導入するようレンチウイルスを用いた導入実験を行った。これら遺伝子を安定に発現する HepG2 細胞株をそれぞれ作成した。

(3) 遺伝子産物の役割を解析するために、遺伝子特異的にノックダウンする shRNA をレンチウイルスを用いた発現系で導入し、ノックダウン程度を RT-PCR 法とウエスタンブロット法にて確認した。shRNA を複数種用意し、場合によっては shRNA に抵抗性の分子を細胞に戻すことで機能的な回復が得られるか確認した。

(4) STAT3 の各種変異体を作成し、HepG2-Stat3 ノックダウン細胞にレンチウイルスを用いて戻す再構成系を用いた。STAT3 の発現量は、定量的 RT-PCR と抗 STAT3 抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて検討した。

(5) 20 ng/ml の IL-6 にて HepG2 細胞を刺激し、標的遺伝子活性化レベルを mRNA の定量とクロマチン免疫沈降法にてそれぞれの分子が STAT3 依存的に標的遺伝子プロモーター領域と遺伝子 3' 下流領域に来るのかどうかを定量的に測定した。

(6) STAT3 タンパクの Y705 チロシンリン酸化の持続やチロシン脱リン酸化の過程を観察するため、IL-6 刺激 15 分後にスタウロスポリンを投与し、チロシンキナーゼ活性の抑制条件のもと Y705 チロシンリン酸化の変動をモニターした。

(7) チロシン脱リン酸化酵素 TC45 のノックダウンと過剰発現を行った。

4. 研究成果

(1) まず IL-6 刺激後の STAT3 依存的な転写を検討するため、HepG2 細胞で IL-6 刺激により発現が強く誘導され、Stat3 ノックダウンするとその誘導が大きく低下する遺伝子として二つの遺伝子 *socs3* と *saal* を選んだ。これら遺伝子群の発現は、CDK9 の阻害剤として知られる薬剤 (H7, Flavopiridol, DRB) で強く抑制されたが、CDK9 を特異的に 90% ノックダウンしても二つの遺伝子とも IL-6 刺激後の発現誘導はほとんど低下することがなかった。

(2) そこで CDK9 と同様の活性のある分子群を探すことにした。IL-6 刺激により、TAK1 とそれにつづき NLK が活性化されることを報告していたことから、まずはそれぞれのノックダウンを様々に試みたが、遺伝子発現誘導を抑制することはなかった。

CDK9 とキナーゼ構造の似たキナーゼとして、CDK12 と CDK13 があることから、それぞれのキナーゼが IL-6 刺激後 STAT3 依存的に標的遺伝子プロモーターと遺伝子上にリクルートされるかどうかを検討した。Flag-CDK12 または Flag-CDK13 を安定的に発現した HepG2 細胞を用いた。クロマチン免疫沈降法と定量的 PCR を用いて検討したところ、これら CDK12 と CDK13 が標的遺伝子上にリクルートされることが確認された。ただし機能的にこれらキナーゼがどの程度の役割を持つのかを確認することは大変難しかった。その頃、CDK12 と CDK13 が Pol II CTD キナーゼとして作用する際には、cyclin L ではなく cyclin K を

調節サブユニットとして用いているとの報告がなされたため、CDK9 と Cyclin K のダブルノックダウンを行ったが、STAT3 依存的な遺伝子発現誘導が低下することはなかった。実験上、3つのキナーゼを同時にノックダウンした細胞を得ることは困難であり、なお役割を確定しえていない。STAT3 依存的にもたらされる転写伸長複合体そのものを DNA 上に回収し解析する技術の開発が必須と考えている。

(3) STAT3 依存的な転写の際にはメディアエーター複合体が必須とされている。pTEFb のリクルートメントには、直接転写活性化因子に CDK9/Cyclin T がリクルートされる場合とメディアエーター以降にリクルートされる場合とがあり、後者の場合、AFF4, ELL2 を含む超伸長複合体と結合した pTEFb が転写開始部位にやってくるということが報告された。未知の転写伸長キナーゼが同様の機序でリクルートされる可能性がある。そこで ELL2 や AFF4 を含む超伸長複合体のリクルートメントとその役割を検討することにした。標的遺伝子上に STAT3 依存的なリクルートメントがあることは確認されたが、役割については標的遺伝子により異なること、ELL2, AFF4 それぞれの必要性も転写因子の違いや標的遺伝子の違いに応じて異なる可能性があり、なお解明すべき点が多い。

(4) STAT3 Ser727 リン酸化の役割としては、STAT3 S727A という変異型 STAT3 と野生型 STAT3 をノックダウン細胞に戻すという再構成系を用いて解析している。Ser727 を残したままリン酸化の起こらないという条件での解析は現状ではできないという問題点がある。ただしリン酸化をミミックすると期待される S727D という変異型を用いることはできる。このような問題はあつたことを承知の上、それぞれの再構成株を用いて検討を行った。IL-6 刺激により STAT3 依存的に発現誘導される *socs3* mRNA 発現を野生型、S727A 変異体の STAT3 発現細胞で比較したところ、S727 変異体では、野生型に比べ、刺激後 4 5 分では 1/2 程度の発現量であったが、3 時間後にも同程度の発現が持続していた。この持続は、SOCS3 によるネガティブフィードバックの見られない受容体での刺激でも観察されたことから、STAT3 自体に備わる制御機序が存在すると考えられた。また上記結果と一致して、ChIP アッセイにて STAT3 の *socs3* 遺伝子プロモーターへの結合と *socs3* 遺伝子上の RNA Pol II の存在を検討したところ、STAT3 S727A 変異体では、プロモーターへの STAT3 リクルートメントは STAT3 の活性は、リン酸化 Y705 による 2 量体形成が重要であることから、Y705 のリン酸化と脱リン酸化を検討した。

それらの実験の結果、STAT3 は Ser727 リン酸化依存的に Y705 の脱リン酸化が促進されることを見いだした。STAT3 の核への移行を阻害する 2 種の STAT3 変異体を用いたところ、これらはリン酸化 Ser727 依存的な pY705 の脱リン酸化はかなり少なくなったことから、この脱リン酸化が主に核内でおこると考えられた。

(5) このような核内にある STAT3 チロシン脱リン酸化酵素として、TC45 の関与が疑われ、その関与をノックダウンと過剰発現の両者のアッセイにより確認した。TC45 ノックダウン条件では、STAT3 野生型の pY705 脱リン酸化が起こりにくくなったが、STAT3 S727A ではほとんど影響を変化はなかった。TC45 を過剰発現させると、STAT3 野生型の pY705 はより脱リン酸化を受けやすくなったが、STAT3 S727A の pY705 の持続、脱リン酸化は促進されることはなかった。これらは、Ser727 リン酸化依存的に起こる pY705 脱リン酸化は、主として核内にある TC45 によるものであることを示している。これに一致して、TC45 ノックダウン細胞では、野生型 STAT3 依存的な *socs3* mRNA 発現が遷延したが、STAT3 S727A 依存的な *socs3* mRNA の kinetics は全く変化がなかった。

(6) STAT3 と TC45 の間の相互作用を検討した。IL-6 刺激後、STAT3 野生型、S727A 変異とも刺激後、TC45 との間に相互作用が起こり、この強さは両者で違いはなかった。様々な実験から、Ser727 リン酸化依存的に起こる何らかの修飾が TC45 作用を高めると考えている。

以上、STAT3 依存的な転写制御のしくみの理解について進展が見られたが、当初計画した実験がうまくいかず STAT3 依存的な転写伸長に関わる分子群の同定作業、役割の解明、複合体に含まれる分子組成などの決定などは継続して追求すべき課題として残った。技術的な問題を克服し、追求していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Ryohei Wakahara, Hiroyuki Kunitomo, Kanae Tanino, Hirotsada Kojima, Akira Inoue, Haruo Shintaku and Koichi Nakajima. Phospho-Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho-Tyr705 largely through TC45. *Genes Cells* 査読有、2012, 17, 132-145

- ② Hirotada Kojima, Hiroyuki Kunimoto, Toshiaki Inoue and Koichi Nakajima. The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL-6/gp130-induced premature senescence in human fibroblasts. Cell Cycle 査読有、 2012, 11, 730-739

[学会発表] (計2件)

- ① Hirotada Kojima, Hiroyuki Kunimoto, and Koichi Nakajima. Prolonged stimulation of gp130 leads to premature senescence of human diploid fibroblasts. 第14回国際免疫学会 2010. 8. 26 神戸
- ② Ryouhei Wakahara, Hiroyuki Kunimoto, Hirotada Kojima and Koichi Nakajima. Phospho-Ser727 of STAT3 shortens the duration of STAT3 by enhancing the dephosphorylation of pY705 through nuclear TC45. 第40回日本免疫学会学術集会 2011. 11. 29 幕張メッセ

[図書] (計1件)

中嶋弘一、小島裕正 JAK-STAT の標準経路と非標準経路モデル 医学のあゆみ 査読なし 2010; 234(5): 325-330

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし