

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20790051  
 研究課題名 (和文) インターフェロン誘導性タンパク質 DAXX が担う B 細胞アポトーシス機構の解明  
 研究課題名 (英文) Analysis of DAXX-mediated cell death in pro-B cell line

研究代表者  
 室本 竜太 (MUROMOTO RYUTA)  
 北海道大学・大学院薬学研究院・助教  
 研究者番号：30455597

研究成果の概要 (和文)： I 型インターフェロンが生体内で果たす作用のひとつとしてプロ B 細胞への細胞死誘導があり、B 細胞発生の恒常性維持に寄与している。その過程にはインターフェロンによって誘導される核タンパク質 DAXX が必須であると報告されたが細胞死促進機序の詳細は不明であった。本研究では転写因子 STAT3 のはたらきに依存して増殖するプロ B 細胞株を用いた解析により、DAXX による STAT3 機能の抑制が細胞死誘導と関連することを含め新たな知見を得た。

研究成果の概要 (英文)： Interferon- $\alpha$  and - $\beta$  inhibit the interleukin-7-mediated growth and survival of T and B lymphoid progenitors. DAXX expression has been reported to be essential for the inhibitory effect of type I interferons, although the mechanisms involved remain unclear. Here, we examined the role of DAXX in the gp130/STAT3-dependent cell growth/survival signals. We found that DAXX suppresses gp130-mediated cell growth and survival thorough the transcriptional repression of genes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：インターフェロン, DAXX, アポトーシス, STAT3, 免疫学, 分子生物学, サイトカイン, TYK2

## 1. 研究開始当初の背景

I 型インターフェロン (インターフェロン  $\alpha/\beta/\omega$  等) は、抗ウイルス活性や抗腫瘍活

性をもつことがよく知られており、C 型肝炎や慢性骨髄性白血病等の治療薬として既に臨床で用いられているサイトカインである。近年では、ウイルス由来の核酸を検知するセ

ンサーである Toll 様受容体や RIG-I 分子の活性化の下流で、感染時に生体内で多量に産生されるメカニズムも解明され、自然免疫系の生体防御反応における役割も注目されている。

I 型インターフェロンのもつ多様な作用のうち本研究では特に、骨髄で B 細胞の生存を抑制する制御因子としての機能に着目した。

B 細胞の発生・分化は骨髄で起こり、分化段階の比較的初期にあたるプロ B 細胞からプレ B 細胞への分化過程では、インターロイキン 7 (IL-7) を始めとするさまざまなサイトカインの作用によって B 前駆細胞の分化・生存・増殖が維持されている (Rajewsky, Nature 1996;38:751)。これに対して I 型インターフェロンはプロ B 細胞にアポトーシスを誘導し、異常な (適切な応答性をもつ抗原受容体遺伝子を構成して発現させることができなかった) B 細胞の誤った増殖を防ぎ、B 細胞の品質を管理する役割をもつサイトカインであると考えられている (Wang ら、Immunity 1995;3:475)。

マウスに I 型インターフェロンを投与すると B 細胞の発生はプロ B 細胞の段階でブロックされ (Lin ら、J Exp Med 1998;187:79)、I 型インターフェロン受容体ノックアウトマウスでは、B 細胞のレパトア管理の厳密性が失われ、B 細胞の異常増殖と自己免疫疾患様症状を示すことも報告されている (Vasconcellos ら、Int Immunol 1999;11:279)。これらの事実から、B 細胞生存制御におけるインターフェロンシグナル伝達系の解明は、自己免疫疾患や B 細胞由来の白血病に対する新規治療薬開発に向けての有用な知見をもたらすものであると考えられた。これまでに、インターフェロンによるプロ B 細胞のアポトーシス機構には DAXX という、インターフェロン刺激によって遺伝子発現が誘導される核タンパク質が必須であることが明らかとされていた (Gongora ら、Immunity 2001;14:727)。また近年、リンパ球特異的 DAXX トランスジェニックマウスを用いた解析から、DAXX が B 細胞や T 細胞でアポトーシスを促進する機能をもつことが示唆され、リンパ球における役割が注目され始めているが (Salomoni ら、Cell Death Differ 2006;13:672、Leal-Sanchez ら、Cell Death Differ 2007;14:795)、DAXX がリンパ球の細胞死を促進する機序については十分な解析がなされていなかった。

共同研究を含むわれわれのこれまでの研究により、インターフェロン受容体に会合するチロシンキナーゼのひとつ TYK2 のノックアウトマウス由来 B 前駆細胞は、野生型マウス由来 B 前駆細胞と比較してインターフェロン刺激による細胞死と DAXX 誘導が著しく阻害されることが明らかとなっており、またイ

ンターフェロン刺激時に DAXX が核に集積する応答も阻害されていた (Shimoda ら、J Immunol 2002;169:4707、Aoki ら、Exp Haematol 2003;31:1317)。

インターフェロンによるプロ B 細胞のアポトーシスにおいて、DAXX の核への集積が重要であることは、われわれの別の研究によって裏付けられていた (Muromoto ら、J Immunol 2006;177:1160)。すなわち、翻訳後修飾機構のひとつ SUMO 化による修飾を受けることが知られる部位への点突然変異を導入することにより、核に局在できない変異体型 DAXX を作製して機能解析を行った。その結果インターフェロンによるプロ B 細胞株のアポトーシス誘導は、核に局在する野生型 DAXX の高発現によって促進されたが、変異体型 DAXX によってはまったく促進されなかった。

## 2. 研究の目的

上述の背景から、本研究では以下に示す 2 つの課題を設定し研究を行った。

### (1) STAT3 機能に依存したプロ B 細胞の生存・増殖に対する DAXX の影響の解明

本研究で着目する第一のポイントは、核に局在する DAXX が具体的にどのようにしてアポトーシスを促進するかを解明することである。DAXX は遺伝子転写を抑制する機能をもつことが報告されており、われわれはそれが B 細胞のアポトーシスと関連すると推測した。われわれは現在までに、DAXX と核内で共局在して機能的相互作用するタンパク質として新規に 3 種類 (DMAP1、TSG101、STAT3) を同定し、論文発表してきた (Muromoto ら、J Immunol 2004;172:2985、Biochem Biophys Res Commun 2004;316:827、Oncogene 2006;25:2131)。これらのうち特に、DAXX による STAT3 の機能抑制に注目した。シグナル伝達性転写因子として知られる STAT3 は標的遺伝子の転写誘導を介して細胞の生存や増殖を促進する機能をもつことが解明されており、その異常活性化がリンパ球の腫瘍も含めたさまざまな癌の発症につながる事が明らかとされている。さらに海外のグループによる STAT3 コンディショナルノックアウトマウスを用いた B 細胞分化研究から、STAT3 がプロ B 細胞の細胞死を防ぎ、細胞の生存を維持する役割をもつことが示され (Chou ら、Blood 2006;108:3005)、B 細胞の細胞死制御という観点においても STAT3 の重要性が指摘された。上述のようにわれわれは DAXX が STAT3 の機能を抑制することを数種類のヒト癌細胞株を用いて検証し報告したが、両分子の相互作用が癌細胞株のみならず、プロ B 細胞の生存・増殖の制御においても役割をもつ

ことが考えられた。

よって本研究では、「プロ B 細胞の生存・増殖の制御を担う分子機構のひとつは DAXX が STAT3 の機能を抑制することである」という仮説を検証し、インターフェロン刺激によって誘導される DAXX の役割を明確にすることを第一の目的とした。

## (2) TYK2 の新規結合分子の機能解析・DAXX の遺伝子発現誘導経路の同定

本研究で着目する第二のポイントは、TYK2 がいかんして DAXX 遺伝子発現の誘導を促すのか、また、B 細胞のアポトーシスにおける TYK2 の役割は DAXX 誘導のみで説明がつくのかという点を明らかにすることである。

上述のように、インターフェロンによるプロ B 細胞のアポトーシスには TYK2 が重要であると判明している。インターフェロンのシグナル伝達において TYK2 の主要な基質タンパク質として、シグナル伝達性転写因子 STAT1 が知られている。STAT1 は抗ウイルス応答を始めとしてインターフェロンの作用のほとんどに必須であるが (Meraz ら、Cell 1996;84:431, Durbin ら、Cell 1996;84:443)、一方 B 細胞のアポトーシスには必須ではないと報告された (Gongora ら、J Immunol 2000;165:2362)。よって、インターフェロンによる B 細胞のアポトーシスや DAXX の誘導においては、STAT1 以外の、未知もしくは既知であるが未だ重要性の認識されていないシグナル伝達経路が関わっていると想定された。

よって本研究では、TYK2 の関わるシグナル伝達経路と制御機構について着目して解析を行い、DAXX 誘導や B 細胞のアポトーシスに至る特異的なシグナル伝達経路を同定することを第二の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) STAT3 機能に依存したプロ B 細胞の生存・増殖に対する DAXX の影響の解明

IL-3 依存性マウスプロ B 細胞株 BaF-B03 細胞由来のトランスフェクタントである、BaF-G133 という細胞株を研究に用いた。この細胞株は IL-6 ファミリーサイトカイン受容体複合体に共通のシグナル伝達鎖として知られる gp130 の細胞内ドメインの一部 (膜貫通領域から 133 アミノ酸) と G-CSF 受容体の細胞外ドメインからなるキメラ受容体を過剰発現させた細胞株である。G-CSF 刺激を加えるとキメラ受容体が 2 量体化し、細胞内では gp130 からのシグナル伝達系が特異的に活性化される。この結果、BaF-G133 細胞では、gp130 からの特異的なシグナル (STAT3 の活

性化及び MAPK 経路の活性化) と細胞応答 (細胞の生存維持と増殖) を検出することができる。この生存維持と増殖は STAT3 の活性化に依存していることが明らかとされており (Fukada ら、Immunity 1996;5:449)、BaF-G133 細胞はプロ B 細胞における STAT3 依存性増殖を簡便にモニターできる実験系として有用である。この細胞に siRNA を導入することにより、一過性の DAXX ノックダウンを行い STAT3 の機能に対する影響を解析した。特に、DAXX がもつ転写抑制機能に着目していることから STAT3 の転写標的遺伝子 mRNA 発現量や制御領域への結合を RT-PCR 法やクロマチン免疫沈降法等の手法で解析した。他に STAT3 の機能を測る指標として、細胞増殖、抗アポトーシス作用、細胞周期進行、STAT3 のリン酸化等について、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット法等の種々の実験により解析した。

### (2) TYK2 の新規結合分子の機能解析・DAXX の遺伝子発現誘導経路の同定

TYK2 をベイトとした Yeast two-hybrid 法により新規 TYK2 結合タンパク質の探索を行い、リンパ球の生存や免疫系の制御において役割をもつことが推測される数種類の候補タンパク質を同定した。これらの候補タンパク質が哺乳動物細胞内でも TYK2 と会合するかについて免疫沈降法により、また TYK2 の機能に与える影響を RT-PCR 法やルシフェラーゼアッセイ等で解析した。

また、マウスプロ B 細胞株を用いインターフェロンによって活性化される既知のシグナル伝達経路について、各種特異的阻害剤を用いて DAXX 誘導への関与を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) STAT3 機能に依存したプロ B 細胞の生存・増殖に対する DAXX の影響の解明

リンパ球を含む細胞の増殖や生存維持に重要な転写因子 STAT3 の活性に対する Daxx の影響について解析を行い、研究の進展が得られた。

BaF-G133 細胞を用いた細胞増殖試験の結果、内在性 DAXX のノックダウンによって STAT3 依存性の細胞増殖が有意に促進された (図 1)。STAT3 の標的遺伝子の発現や細胞周期進行についても DAXX のノックダウンによって促進が認められた。また共免疫沈降実験の結果、内在性の DAXX は STAT3 と細胞内で会合した。さらに DAXX のノックダウンによって STAT3 の転写標的遺伝子 JunB 遺伝子プロモーターへの結合が増強された。一方で STAT3 のチロシンリン酸化に対しては DAXX に

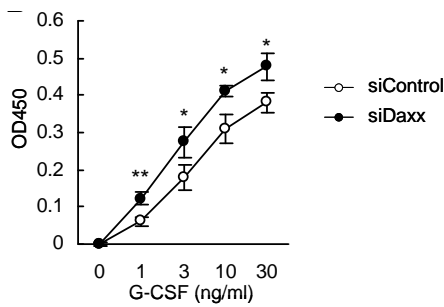


図 1. BaF-G133 細胞を用いた細胞増殖試験。DAXX ノックダウンによって STAT3 依存的増殖が促進される

よる影響は認められなかった。つまり DAXX は、STAT3 活性化の段階ではなく、活性化後の STAT3 が標的 DNA に結合する段階を妨げることで遺伝子発現を抑制する役割を持つことが判明した。

研究を推進する過程において、DAXX が STAT3 抑制とは独立の細胞死促進機序をもつことも判明した。すなわち BaF-G133 細胞において DAXX は細胞死抑制タンパク BCL-2 の遺伝子発現を抑制する機能を持ち、これも細胞死促進に寄与することが明らかとなった。

以上より DAXX は、転写因子 STAT3 に対する機能抑制と STAT3 を介さない機序による BCL-2 発現抑制の、少なくとも二つの機序によってマウスプロ B 細胞株の細胞死を促進することが示された。

核内に局在した DAXX が果たす具体的な役割はこれまで明らかではなかったが、本研究は DAXX のもつ転写抑制機能がプロ B 細胞株の細胞死促進と関連することを初めて示した。また DAXX が抑制する標的転写因子として STAT3 が同定された。よって今後 STAT3 との相互作用を含む DAXX 機能や DAXX 発現量に対する人為的制御法を開発することにより、リンパ球の増殖制御異常に起因する病態の改善や、STAT3 が関連することの知られるがん・自己免疫疾患に対する新たな治療方策を社会に提供できる可能性が考えられる。

尚、本研究成果をまとめた論文は現在学術誌に投稿中である。

## (2) TYK2 の新規結合分子の機能解析・DAXX の遺伝子発現誘導経路の同定

DAXX 遺伝子発現を司るキナーゼとして報告されている TYK2 チロシンキナーゼの機能制御に着目し解析を進め、進展が得られた。

酵母 two-hybrid 法によって単離された TYK2 新規結合タンパクのひとつ Jun activation domain-binding protein 1 (JAB1) はこれまでインターフェロニンシグナルへの関与は知られていなかった。本研究における解析で、siRNA による JAB1 発現抑制に伴いインターフェロニンシグナル伝達分子 STAT1 の

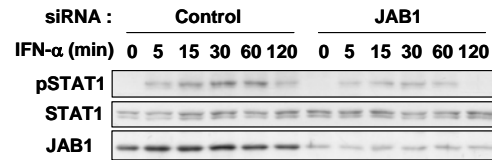


図 2. ウェスタンブロット法による STAT1 のリン酸化解析。JAB1 ノックダウンによりインターフェロン刺激時のリン酸化が抑制される

リン酸化が抑制された (図 2)。また、TYK2 や STAT3 のリン酸化及びインターフェロン応答性遺伝子発現についても JAB1 ノックダウンによって抑制された。さらに JAB1 ノックダウンによって、インターフェロン受容体複合体を構成する IFNAR1 サブユニットタンパクの細胞内総量が減少した。TYK2 ノックダウンにより IFNAR1 タンパク量が減少するという既知の結果も再現され、これは JAB1 ノックダウンによる効果と一致していた。また JAB1 はイソペプチダーゼ酵素活性をもつ。そこで活性を担う領域に存在する 151 番目のアスパラギン酸残基に点変異を導入した不活性型分子を過剰発現させて IFNAR1 タンパクに対する安定化作用をウェスタンブロット法で調べたが、野生型と同様に IFNAR1 安定化能が保持されていた。以上より TYK2 新規結合タンパク質 JAB1 はその酵素活性とは独立に IFNAR1 安定化に関与し、インターフェロニンシグナルの適切な伝達に寄与することが初めて示された。現在 TYK2 と JAB1 の機能的相互作用の詳細についてさらなる解析を進めており、論文を作成中である。

インターフェロンによる DAXX 発現誘導経路について、マウス由来プロ B 細胞株と各種シグナル伝達経路特異的阻害薬を用いた解析から DAXX 発現促進には MAP キナーゼファミリーに属する c-Jun N-terminal kinase 活性化が部分的に寄与することを示す結果が得られた。一方、その実験結果の一般性を確認する目的で複数種類の細胞株を用いた解析を行ったが、予想外なことにヒト由来の細胞株ではインターフェロンによる DAXX 発現誘導がほぼ認められなかった。すなわち DAXX の遺伝子発現誘導機構においてはマウス由来細胞とヒト由来細胞とで、インターフェロニンシグナルの寄与が異なると判明した。われわれは以前の研究においてインターフェロンによる DAXX タンパクの翻訳後修飾や局在変化等についてはヒト由来細胞においても促進されることを観察しているため (Muromoto ら、J Immunol 2006;177:1160)、インターフェロン刺激時のヒト細胞内における DAXX のはたらきは、遺伝子発現によってよりもむしろ翻訳後修飾等によって制御されているものと改めて示唆された。

但し、ヒトにおける、あるいは生物種を超

えて保存されている DAXX 遺伝子発現制御機構の本質解明は有用な知見となる点には変わらない。上述のように DAXX 発現の人為的制御法の開発はリンパ球増殖異常の是正や免疫疾患の治療法開発に貢献できる可能性がある。また、臨床において抗ウイルス薬としてインターフェロンを治療に用いる際に問題となる副作用のひとつ、骨髄抑制についても、他の薬剤の併用等により DAXX 発現を減少させておくことで骨髄細胞死を抑制できれば、治療時副作用の低減につながる可能性がある。よって DAXX 発現制御機構については現在、サイトカインシグナルに視点を限局せず、エネルギー代謝系やストレスシグナル等の関与も考慮した多角的なアプローチにより解析を継続中である。

#### 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 4 件)

- ① Ikeda O, et al., Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor regulates enhanced activation of signal transducer and activator of transcription 3 by epstein-barr virus-derived epstein-barr nuclear antigen 2., *Biol Pharm Bull.*, 査読有, 32 巻, 2009, 1283-1285
- ② Muromoto R, et al., The exon-junction complex proteins, Y14 and MAGOH regulate STAT3 activation., *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有, 382 巻, 2009, 63-68
- ③ Muromoto R, et al., Epstein-Barr virus-derived EBNA2 regulates STAT3 activation., *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有, 378 巻, 2009, 439-443
- ④ Ohbayashi N, et al., The IL-6 family of cytokines modulates STAT3 activation by desumoylation of PML through SENP1 induction., *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有, 371 巻, 2008, 823-828

[学会発表] (計 16 件)

- ① 志賀要ほか, EJC 構成タンパク質 Y14, MAGOH による STAT3 活性の制御, 日本薬学会 第 130 年会, 2010 年 3 月 28 日, 就実大学, 岡山
- ② 黒田誠ほか, *P. acnes* 誘導性肉芽腫形成における Tyk2 の役割, 日本薬学会 第

130 年会, 2010 年 3 月 28 日, 就実大学, 岡山

- ③ TOGI Sumihito, et al., HDAC3 influences phosphorylation of STAT3 at serine 727 by interacting with PP2A., 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009 年 12 月 2 日, 大阪国際会議場, 大阪
- ④ MUROMOTO Ryuta, et al., A new biological function of Jun activation domain-binding protein 1(JAB1) / CSN5 in the regulation of type I interferon signaling., 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009 年 12 月 2 日, 大阪国際会議場, 大阪
- ⑤ KAMITANI Shinya, et al., KAP1 negatively regulates TNF-alpha-induced NF-kappaB activation., 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009 年 12 月 2 日, 大阪国際会議場, 大阪
- ⑥ 志賀要ほか, EJC 構成タンパク質 Y14, MAGOH による STAT3 活性の制御., 第 133 回日本薬学会北海道支部例会, 2009 年 11 月 28 日, 北海道医療大学札幌サテライトキャンパス, 札幌
- ⑦ 池田収ほか, アダプタータンパク群による EB ウイルス遺伝子産物 LMP1 の活性制御機構の解析, 第 133 回日本薬学会北海道支部例会, 2009 年 11 月 28 日, 北海道医療大学札幌サテライトキャンパス, 札幌
- ⑧ 宮坂優人ほか, 乳癌特異的チロシンキナーゼ Brk とアダプター分子 STAP-2 の機能的相互作用の解析, 第 132 回日本薬学会北海道支部例会, 2009 年 5 月 30 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌
- ⑨ 碓澄仁ほか, HDAC3 は PP2A と相互作用し STAT3 の Ser リン酸化を制御する, 第 132 回日本薬学会北海道支部例会, 2009 年 5 月 30 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌
- ⑩ Ryuta Muromoto, et al., Daxx inhibits cytokine-dependent survival of a hematopoietic cell line by influencing Bcl-2 expression., *Keystone Symposia, Cell Death Pathways (X5)*, 2009 年 3 月 24 日, TELUS Whistler Conference Centre, カナダ
- ⑪ KAWAKAMI Shiho, et al., The IL-6 family of cytokines modulates STAT3 activation by desumoylation of PML through SENP1 induction., 第 38 回日本免疫学会学術集会, 2008 年 12 月 3 日, 国立京都国際会館, 京都
- ⑫ KAMITANI Shinya, et al., インターフェロンシグナル制御における核内コリプレ

- ッサー-KAP1 の機能解析, 第 38 回日本免疫学会学術集会, 2008 年 12 月 3 日, 国立京都国際会館, 京都
- ⑬ TAIRA Naohisa, et al., An RNA binding protein, Y14 interacts with and modulates STAT3 activation., 第 38 回日本免疫学会学術集会, 2008 年 12 月 3 日, 国立京都国際会館, 京都
  - ⑭ YAMAMOTO Yu, et al., ユビキチン E3 リガーゼによる TGF- $\beta$  シグナル伝達の制御, 第 38 回日本免疫学会学術集会, 2008 年 12 月 3 日, 国立京都国際会館, 京都
  - ⑮ MUROMOTO Ryuta, et al., Daxx inhibits gp130/STAT3-mediated survival of BaF3 cells by influencing Bcl-2 expression., 第 38 回日本免疫学会学術集会, 2008 年 12 月 3 日, 国立京都国際会館, 京都
  - ⑯ 室本竜太, サイトカイン誘導性細胞増殖・生存の制御における Daxx の役割, 日本生化学会北海道支部・日本生物物理学会北海道支部・北海道分子生物研究会共催 2008 年度合同シンポジウム 生命現象の分子レベルでの解明, 2008 年 11 月 21 日, 北海道大学大学院理学研究院 5 号館大講義室, 札幌

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/org/eisei01.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

室本 竜太 (MUROMOTO RYUTA)  
北海道大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号: 30455597

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし