

新規情報伝達分子CISの機能とサイトカインによる転写調節機構の解析

Function of a novel signal transducing molecule, CIS and its transcriptional activation mechanism by cytokines.

代表研究者 入留米大学分子生命科学研究所 教授 吉村 昭彦

Professor, Institute of Life Science, Kurume University

Akihiko YOSHIMURA

We searched for immediate early cytokine responsive genes and isolated a novel gene, CIS (Cytokine Inducible SH2 containing protein) which is induced in hematopoietic cells by a subset of cytokines including interleukin 2 (IL2), IL3, and erythropoietin (EPO). We cloned 5'-flanking region of the CIS gene, and found that about 100-200 bases upstream of the transcription-initiation site of the CIS gene contain four possible STAT5 binding sites (MGF boxes). Luciferase reporter assay revealed that these MGF boxes were essential for EPO-dependent promoter activity. Expression of STAT5 and the EPO receptor in HEK293 cells conferred EPO-dependent activation of the CIS promoter. These data indicates that CIS is a target of JAK-STAT5 pathway of cytokine receptors. CIS contains an SH2 domain and binds to the tyrosine-phosphorylated EPO and IL3 receptors and modulates STAT5 activity. Thus, CIS is a unique negative-feedback regulator of STAT5; its expression is induced by STAT5 and inhibits STAT5 activation probably by competing the STAT5 binding sites on the receptor.

1 目的

インターロイキン (IL) やコロニー刺激因子、エリスロポエチン (EPO) などのサイトカインは造血系免疫系細胞の増殖分化を制御する液性因子群である。近年サイトカイン受容体の情報伝達経路の解明が急速にすすんでいる。現在までのところ JAK 型チロシンキナーゼがサイトカイン受容体の細胞内ドメインに会合し、受容体のシグナル伝達機構にとって最も重要な役割をはたすことが分かっている。JAK キナーゼは受容体の増殖シグナルを伝達するのに必要な膜付近のドメインに結合し、受容体および転写因子 STAT をりん酸化する。STAT は SH2 ドメインを持ち、これを介してチロシンりん酸化された受容体と結合し、次に JAK によってりん酸化をうけると考えられている。りん酸化をうけた STAT はホモまたはヘテロ 2 量体化し、核へ移行して標的遺伝子の転写を促進する。この JAK-STAT 経路はサイトカインに比較的ユニークな経路で、その作用は直接遺伝子発現を調節するものなので、サイトカインの機能発現にきわめて重要であることが示唆される。IL2, IL3, GM

-CSF, EPO、トロンボポエチンなど多くのサイトカインは STAT5 を介して遺伝子の発現調節を行うことが明かにされてきたが JAK-STAT5 経路の最終標的である応答遺伝子がほとんど明らかでなく、この経路の生理的な意義は不明であった。

我々はいちはやくサイトカインの標的遺伝子に着目し、EPO, IL2, IL3 などのサイトカインによって共通に転写誘導される遺伝子のクローニングに成功した。これらのうち SH2 ドメインを有する新規遺伝子 CIS (cytokine inducible SH2-protein) と多機能性サイトカインであるオンコスタチン M (OSM) を見出した。本課題ではサイトカインによる CIS の転写調節機構とサイトカインの作用における機能について研究を行った。

2 研究経過

(1) CIS の転写誘導機構

CIS は様々な骨髄系、リンパ球系のサイトカイン依存性細胞において IL2, IL3, GM-CSF, EPO で誘導される

がIL6, G-CSF, SCFでは誘導されなかった。サイトカインによるCISの転写促進の機構を調べるために両者の5'非転写領域約1キロベースをクローニングした。これをルシフェラーゼ・レポーター遺伝子につないでプロモーター活性をBa/F3細胞で調べたところIL3に反応して転写促進を受けることが確認された。これらの遺伝子のプロモーター領域にはGAS (gamma-activated sequence) 様配列 (TTCNNNGA A; MGF boxと呼ぶ) が複数存在し、この領域を欠失させるとサイトカインによる転写誘導が起こらなくなった (図1)。すでにSTAT5はプロラクチンだけでなくEPO、IL2、IL3、GM-CSFなど多彩なサイトカインによって活性化されることが知られており、CISはSTAT5の標的遺伝子であることが強く示唆された。そこでHEK細胞においてCISのプロモーターをもつレポーター遺伝子をSTAT5およびEPO受容体cDNAと同時に発現させるとEPOに依存したレポーター遺伝子の活性化がみられた。STAT5あるいはEPO受容体cDNAを除くとそのような活性化は著しく減少した。またGAS配列に変異を入れたレポーターでは活性化は起こらなかった。さらにIL2受容体β鎖のC末端側を削った場合、細胞増殖やc-mycの誘導は正常に起こるがSTAT5は活性化できないことが知られている。すなわちIL2受容体β鎖の場合、STAT5のSH2ドメインがβ鎖のC末端付近のりん酸化チロシン残基を認識して受容体に結合し活性化されると考えられている。この細胞ではIL2によるCISやOSMの誘導は起こらなかった。以上の結果はCISやOSMがSTAT5の標的遺伝子であることを明確に示している。

(2) CISの機能

CISは約260アミノ酸よりなる蛋白質で中央にSH2ドメイン、その両側に80個のアミノ酸からなる機能が未知のドメインを有する新規の遺伝子である (図2)。構造的にはGrb2/Ashのようなアダプター分子に類似しているがSH3は含まない。SDS電気泳動上ではみかけの分子量は37キロと32キロダルトンである。はじめに37キロの分子として合成されおそらく限定分解によって32キロにプロセスされると思われる。さらに47キロの分

```

-865 GAATTCATTTTAAACAAAACAAACAAAGCCAGTCGACAGGGCTGTCTGGGAGCTGACT
ATCTCTCTTTACTGACTCAAGAGGGTAATTTCCCAACTGTCGGTCCACTCAGAGATTAG
-745 GCAAAGAAGGGATGAGATCATTTGATTACAAAAGATTAGATGTAACCTGAACTCTTTTAG
CTGTAGTGACCCACAGTGGACCTCCTTAGTCTTCGCTCCTCTTACAGGCTCCTGGCCTCT
-625 CCCTAAGTCTTTTCCAGATCTCACAGCACACCCACCCTTCTACACAGTGTCTGCAA
TAAGCGAGACCACCGCGCCGACAGACAACTGTCGATAAACTAGAGGGCTGGCTAAGAG
-505 GACCGGCCGACCCGCCCCGCTGCTAGTCTAGGGGGGGGGGATAAGCCACCCA
TCCCCAAGAAGTAGAGGGAAGACAATCTGCTCCAGTTCATCCGATTCCTTTTAA
-385 CTGTGCCCCAACCCAGTCTTTTGGCTACTAGTCTCTAGGTCGCGCCGACCTGGGCACGT
CAGTTCAGGGTCCCTGCACCTCAATAGGTGCGTCTAGATGCTGCTCAGCTCCAGCGAT
-265 ACGATTGGTCAACTTAGGAGCTCCCGCCGAGTTCCTCGAAAGTCTTGGAAATCTG
TCAAAGGTGTTTCTTCTCGGTCCAAGGACTAGAGCCCTGCACCCCGTCCCTCCGG
-145 CGCCGCAAAGCCCGCGTCTTAGGAAAGTAGGCTTCGCGAAAGGCTGGGACGACGCG
ACAAAAGATTAGGAGGCGCTGGCCCGCCCAACCCGACCCGACCCGCTCCCCCTTGTCTT
-25 CCAAGCTGTTCGACCCACAGCTTTCAGTCCCTGCTGCGCCCGGTGTGCCCCGAGCC
TGACCTTCGACCCCTGGACCCATTGGCTCGTCTTCTCTCCATCCCGCGGAATCCGAC
TCTCGAGCCGCGTTGTCTCTGGACATGGTCTCTGCTGACAGGATCT....
M V L C V Q G S....

```

図1. CISプロモーターの配列

下線はMGF boxを矢印は転写開始位置と翻訳開始位置を示す

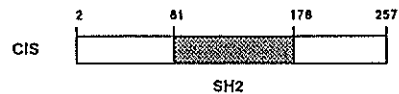


図2. CISの構造

子種も検出されるがその由来は不明である。サイトカインを抜くと急激に分解されるのでユビキチン化されている可能性がある。サイトカインの刺激によって速やかに合成され定常状態では32キロダルトンの分子種がメジャーである。CISはSH2ドメインを有することからチロシンりん酸化された分子と結合することが考えられる。そこでCIS cDNAをMMTVプロモーターの下流につないでIL3依存性のFDC-P1, Ba/F3細胞に導入した。また同時にEPO受容体も発現する細胞も作った。デキサメサゾン添加によりCISの発現は5倍程度増強された。このときIL3やEPOで刺激するとチロシンりん酸化されたIL3受容体やEPO受容体がCISとともに免疫沈降することがわかった。刺激前には会合は見られないことからCISのSH2ドメインが受容体のりん酸化チロシンを認識して会合するものと考えらる (図3)。またIL2受容体β鎖とも結合

した。さらにデキサメサゾンありなしで細胞増殖を調べたところ、CISを強制発現させた場合、弱いながら増殖の抑制が観察された。CISの受容体との会合が受容体からのシグナル伝達にどのような影響を与えるのかが次の問題である。そこでC末端を削ったEPO受容体との結合を調べたところ結合は細胞膜付近のチロシン (Y) 343およびY401を含む領域でおこることがわかった (未発表データ)。この領域はSTAT5の会合する領域と一致する。したがってCISは受容体のリン酸化チロシンをマスクし、STAT5の会合を阻害する効果が考えられる。実際CISの過剰発現はEPO受容体によるSTAT5の活性化を阻害した。CISはSTAT5によって誘導されSTAT5の活性化を阻害することから一種の負のフィードバック調節因子と考えられる。STAT5はサイトカインによる細胞増殖に関与することが示唆されている。したがってCISの過剰発現は細胞増殖を抑制する作用があると考えられる。

(3) CIS遺伝子座の解析

FISH法および連鎖解析の結果、マウスCIS遺伝子は第9染色体のGnai2の近傍に存在することが明らかとなった。この位置はヒトでは3p21に相当する (図4)。この領域には腎臓癌、肺癌のがん抑制遺伝子が存在するといわれている。また臓器分布を調べたところ腎臓、肝臓、肺などの臓器にも高い発現が観察された。上皮系培養細胞ではCISは120キロダルトンのチロシンリン酸化蛋白質と会合しており、CISの過剰発現が細胞増殖を抑制することを我々は見出した。CISのがん抑制遺伝子としての作用にも関心がもたれる。

3 研究成果

(1) CISがSTAT5の標的遺伝子であることを明かにした。

(2) CISが活性化された受容体に結合し、STAT5の活性化を阻害することを見出した。

(3) CISは広範囲の臓器で発現しており、染色体上の位置からも細胞の増殖分化に深く関与する可能性が示唆された。

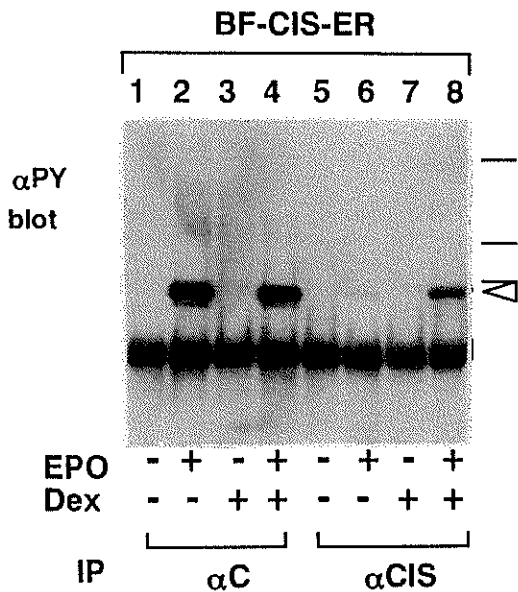


図3. CISとEPO受容体の会合

EPO受容体を発現させたBa/F3細胞 (B) にCIS cDNAをMMTVプロモーターをもつ発現ベクターに組み込んだものを導入した。デキサメサゾン (Dex) 添加によりCISを誘導したのち、EPOで刺激した。細胞抽出液から抗CIS抗体 (α CIS) ないし抗EPO受容体抗体 (α EPO R) により免疫沈降させたのち抗ホスホチロシン抗体でプロットした。IL3やEPOで刺激するとチロシンリン酸化されたEPO受容体がCISとともに免疫沈降することがわかる。Dex非存在下ではCISの発現が少ないためにわずかしか受容体は共沈しない。

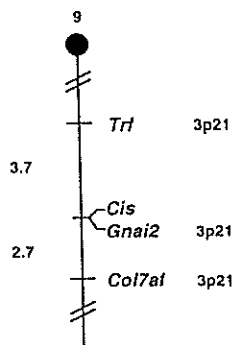


図4. マウスCISの遺伝子座とヒトの相同遺伝子領域

4 今後の課題と発展

我々はJAK-STAT経路の標的遺伝子CISをクローニングし、それがSTAT5のフィードバック調節因子であることを発見したがSTAT5の生理機能を知るためにはさらに多くの標的遺伝子の同定が必要である。またSTAT5は血球や乳腺組織だけでなく広く臓器に分布しており未知の機能があるものと推測されている。遺伝子ノックアウトマウスの作成、プロモーター領域のさらなる解析などを通じて、CISの血球系細胞および上皮系細胞の増殖分化における生理機能の解明を行っていきたい。

5 発表論文 (英文原著)

(1)Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Hara, T., and Miyajima, A. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.* 14, 2816-2816, 1995

(2)Yoshimura, A., Ichihara, M., Kinjyo, I., Moriyama, M., Copeland, N. G., et al.: Mouse oncostatin M: an immediate early response gene induced by multiple cytokines through the JAKs/STAT5 pathway. *EMBO J.* 15, 1055-1063, 1996

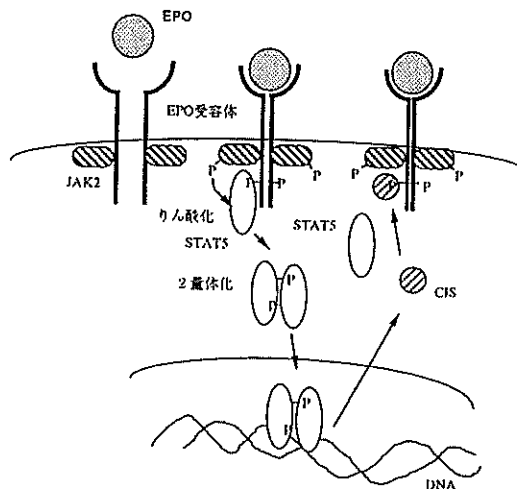


図5. CISの作用機序に関するモデル
EPO受容体におけるSTAT5の活性化とCISによる抑制を示す。Pはチロシン残基のリン酸化を示す。