

研究題目 飽和型変異スキニングによる STAT3 分子の構造機能相関の解明

研究組織

研究代表者：小原 収（公益財団法人かずさ DNA 研究所）

研究分担者：峯岸 克行（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3)はサイトカインによる遺伝子発現調節を制御する転写因子である。IL-6等の炎症性サイトカインによりそのレセプターが架橋、活性化されると細胞内部分に結合している JAK ファミリーキナーゼにより、STAT3 はチロシンリン酸化されて2量体を形成する。核内に移行し、STAT3 応答領域に結合して炎症等に関与する遺伝子発現を制御する。STAT3 遺伝子の機能が喪失する遺伝子変異 (Loss-of-Function; LOF 変異)は、特にその dominant negative (DN) 変異は、高 IgE 症候群 (hyper-IgE syndrome) を引き起こす。これは、重症のアトピー性皮膚炎、高 IgE 血症、Th17 細胞の分化障害による黄色ブドウ球菌感染症と真菌感染症の罹患を特徴とする。STAT3 遺伝子の機能が亢進する遺伝子変異 (Gain-of-Function; GOF 変異)は、先天的な多臓器性自己免疫疾患 (Infantile-onset multisystem autoimmune disease-1 ; ADMIO1) を引き起こす。これらの疾患の患者は重篤な症状を呈するが、遺伝子特異的な治療法がなく、病態の正しい理解に基づいた安全かつ効果的な治療法の開発が必要である。

これらの疾患の原因となる STAT3 の遺伝子変異は、いずれもミスセンス変異で、アミノ酸置換を検出しただけでは、その機能異常の有無、LOF/GOF の判別は不可能である。そこで、本研究では、STAT3 変異体の機能解析を通して、疾患の発症メカニズムを明らかにすることを目的として、STAT3 分子の変異スキニングに

より構造機能相関を解明することを試みた。

[1-2]研究の方法・経過

STAT3は細胞の炎症応答や増殖・分化に重要な役割を果たすタンパク質である。非活性化状態においては、脱リン酸化状態で細胞質内に存在し、細胞外からのサイトカイン・増殖因子等の刺激によりJAK(Janus kinase)によりリン酸化される。リン酸化により活性化されたSTAT3は、2量体を形成、核内に移行してSTAT3応答領域を持つ遺伝子群の発現を調節する因子として機能する。機能低下型の遺伝子変異はヒトにアトピー性皮膚炎、高IgE血症、黄色ブドウ球菌感染症、骨粗鬆症を発症する免疫不全症、高IgE症候群を発症し、逆に機能亢進型のSTAT3変異は全身リンパ節腫脹、自己免疫性血球減少に多臓器性自己免疫疾患 (ADMIO1) を発症する。機能低下型の変異はSTAT3分子のDNA結合ドメイン、SH2ドメイン、転写活性化ドメインに集中しており、これらの変異は転写活性化作用を持つ STAT3 parallel dimerの形成を障害するためドミナントネガティブとして作用すると推測されている。しかし、機能亢進型の変異もそのほとんどがDNA結合ドメイン、SH2ドメイン、転写活性化ドメインに存在しており、機能が亢進するメカニズムは全く明らかにされていない。そこで本研究では、STAT3のDNA結合ドメイン、SH2ドメイン、転写活性化ドメインに飽和変異スキニングを実施し、その変異体の転写活性化能を検討する。それにより、STAT3変異体が機能低下型と機能亢進型の変異体になる分子メカニズムを明らかにし、ミスセンス変異体の機能を

予測できるようにし、さらにSTAT3の変異で発症する2つの疾患の診断を変異解析から直結できるようにする。

今回の研究では、STAT3分子のDNA結合ドメイン、SH2ドメイン、転写活性化ドメインのアラニン飽和変異スキヤニングを実施する。この変異体に対して、ウエスタンブロッティング、レポーター解析、ゲルシフトアッセイ、リアルタイムPCR等による機能解析を行うことにより、変異STAT3分子の機能を解明し、STAT3分子の構造機能相関を明らかにする。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

野生型と各種の変異型STAT3発現ベクターを、HEK293細胞に遺伝子導入し、各種の機能解析を実施した。変異体はDNA結合ドメイン(320-494)、SH2ドメイン(580-670)、転写活性化ドメイン(671-770)のアラニン変異体計366個から、野生型の当該アミノ酸がアラニンであるもの16個を除く350個である。常法に従ってアラニン飽和型変異スキヤニングを実施し、ウエスタンブロッティング、レポーター解析、ゲルシフトアッセイ、リアルタイムPCRによる機能解析を行った。その結果、DNA結合ドメイン、SH2ドメイン、転写活性化ドメインのアラニン変異体の内の約15%が機能喪失型の変異体となった。これらの機能喪失型変異体は、レポーター解析、ゲルシフトアッセイ、STAT3により誘導される分子群のリアルタイムPCRアッセイでは、同様の機能喪失型の結果を呈したが、ウエスタンブロッティングによるチロシンリン酸化の解析では、正常なものと低下しているものに2分された。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

これまでの報告よりSTAT3の機能喪失型変異は約45個ほど報告されているが、その多くが今回我々の発見したアラニン変異体が機能喪失型となる部位と一致していた。さらに、こ

れまで見出されていない部位のミスセンス変異が、機能喪失型変異になることが明らかになった。このことは、当該部位のアミノ酸の側鎖構造がSTAT3の正常機能に必須であることを意味している。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表
未発表

[3-2]学会発表
未発表

[3-3]成果資料等
なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

STAT3の遺伝子変異により発症する疾患、高IgE症候群と若年性多臓器自己免疫疾患(ADMIO1)の原因は、非常に多様なミスセンス変異で、新規なバリエーションでは変異体の機能解析を実施しないと疾患関連性の判断が困難である。本研究では蓄積された網羅的アラニンスキヤニングのデータは、こうした個別の機能解析実験に代わって、STAT3遺伝子のLOF変異を高精度に同定するための貴重な情報源を提供する。しかし、GOF変異の高精度予測は機械学習などを駆使したアプローチでも未だ精度が不十分であり、より網羅性の高い変異スキヤニングと立体構造モデルからの知見の統合的アプローチが必要であろう。今回はアミノ酸残基をアラニンのみで置換した時の機能変化を検出するスクリーニングとしたが、近年のシングルセル解析技術の進歩などを取り込んだ機能評価方法のハイスループット化により、より現実に近い多様なアミノ酸残基置換による機能変化の変異体スクリーニングの実現を目指していきたい。