モデル生物を用いた転写因子 STAT シグナルネットワークの解析

Analyses of STAT Signaling Networks by use of Model Organism

代表研究者　東邦大学　川田健文　Toho University　Takefumi KAWATA
共同研究者　Dundee 大学　福澤雅志　University of Dundee　Masashi FUKUZAWA

STATs (signal transducers and activators of transcription) are transcription factors, which lie at the end of cytokine and growth signal transduction pathways. STATs also play crucial roles in embryogenesis, including those pattern formation processes that require organised morphogenetic cell movement. Thus, it is now of extreme importance to know what genes are regulated by STATs, to understand the molecular mechanism of development. For this purpose, we use the cellular slime mould, *Dictyostelium discoideum*, which is the simplest eukaryotes having STAT proteins, as a model organism. We tried to identify suppressor genes of *STATa*, a one of four STAT genes (*Dd-STATa~d*) of *Dictyostelium*, using a cDNA overexpression library. Although we identified several revertants during screening, identification of the suppressor has been unsuccessful so far. However, we identified a modifier gene, which encodes cyclic nucleotide phosphodiesterase that alters the phenotype of the *statA*-null. We also searched for genes, which are positively regulated by STATa by use of *in situ* hybridization and identified 13 genes. To know the functions of some of the genes, we created knockout mutants and found that a disruption of the *SLF308* gene, which encodes a putative extracellular matrix protein, caused delayed

aggregation and formation of an aberrant fruiting body with a short frail-looking stalk. Such defects are similar to the phenotype of a *statA*-null strain. These data suggest that the *SLF308* is one of targets for STATa and controls morphogenesis, possibly through an interaction between cell surface and extracellular matrices.

研究目的

STAT は免疫応答や発生、細胞分化など多様な生命現象に関わる重要な多機能転写因子で、生体内で他の多くのシグナル伝達系とも密接に関連しシグナルネットワークを形成している。本研究では、１）分子遺伝学的にサプレッサー遺伝子やその他の STAT 関連遺伝子を同定する、２）*in situ* hybridization 法による発現パターンの比較から STAT 標的遺伝子を同定し、これらの機能を解析することで少しでも多くの STAT 関連シグナルを明らかにすることを目標とした。

STAT シグナルは進化的に保存されているが、ネットワークは高等なものほど複雑になる。本研究で用いた細胞性粘菌は STAT シグナルを有する最も簡単な真核多細胞生物である。それゆえ、STAT シグナルネットワークも最も原始的な簡単なものと予想される。細胞性粘菌の整ったゲノム情報インフラを利用することで同定されるネットワークは、高等真核生物におけるゲノムレベルでのシグナルネットワーク構築に多大な貢献をするものと期待される。STAT シグナルを有する最も簡単な真核多細胞生物を用いて解析することで、現在高等真核生物が有している複雑なシグナルネットワークが進化的に獲得された過程知ることができる。また、STAT シグナルは酵母に存在しないという事実から STAT シグナルネットワークの中で酵母に存在しないものは多細胞性獲得のために必要な重要な情報を含んでいると予想され分子進化学上貴重な知見となりうる。

STAT シグナルの異常が様々な疾患と結びついていることが最近明らかになってきている。新規シグナルネットワークの発見はこれらの疾患の治療法の確立に役立つものと予想される。特に、STAT の機能としてガン細胞の浸潤、播種に見られる細胞運動に関係する新規シグナルの発見が予想され、ゲノム

創薬の分野への寄与が期待される。

研究経過

1. cDNA 過剰発現によるサプレッサースクリーニング系の構築

本研究では細胞性粘菌の分子遺伝学的スクリーニングなどを用いて転写因子 STATa に関連する新規の遺伝子を検索してきた。その手段としてまず、STATa 遺伝子破壊株を親株とし REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) と呼ばれるタギング変異体の作成と cDNA ライブラリー導入によって形態に影響を及ぼす遺伝子を単離する２つの方法を用いた。REMI による遺伝学的スクリーニング方は既に確立されたものであるが、cDNA 過剰発現によるサプレッサースクリーニング系は今まであまり報告がない。最初に我々は、染色体外で安定に増殖できるプラスミドを用いて細胞性粘菌の移動体時期から調製した mRNA をもとに cDNA ライブラリーを構築した。これらのライブラリーは非常に多くの独立したクローンを保持しており、海外からも譲与の依頼が来た。このライブラリーを用いて細胞性粘菌の STAT の一つである *Dd-STATa* 遺伝子のサプレッサーをスクリーニングするためには、cDNA プラスミドを安定に多コピー細胞中に保持できるような STATa 変異株を作製する必要がある。この目的で、プラスミドの複製起点に作用するレプリカーゼをコードする遺伝子を組み込んだ STATa 変異株を作製した。

2. STATa 遺伝子破壊株を用いた STATa 関連遺伝子のスクリーニング

2-1. REMI によるスクリーニング

Dd-STATa 遺伝子を破壊した株では、集合が遅くなり発生が移動体期で止まることが分かっている。このような非常に分かりやすい形態のために分子遺伝学的なスクリーニングには非常に適しており、ここでは形態が野生型に近くなるような復帰突然変異を目印に STATa 関連遺伝子を検索した。REMI を用いた STATa 関連遺伝子のスクリーニングではおよそ数 10 万クローンのスクリーニングを試みたが、残念ながらその中に目的とする形態が野生株に近くなるようなものは得られなかった。

2-2. cDNA 強制発現によるスクリーニング

この系を用いて同様に数万クローンのスクリーニングを試みたが、残念ながらその中に目的とする形態が野生株に近くなるようなものは得られなかった。しかしながら、スクリーニングの過程で明らかに分化に影響を及ぼす変異株（modifier mutant）を数個得ることが出来、その原因遺伝子を単離することに成功した。そのうちの１つが cyclic nucleotide phosphodiesterase であることをみつけた。このタンパク質は細胞外に分泌され cAMP の濃度を下げる働きがあることが分かっており、実際に STATa と関連があることが示された。したがって、我々の立ち上げたこの分子遺伝学的スクリーニング法で実際に STAT 関連遺伝子が得られることが確認された。

3. *STATa* 遺伝子部分破壊株を用いた STATa サプレッサーのスクリーニング

STATa が多機能タンパク質であることを考慮すると、復帰突然変異の単離は容易ではなくこのままの方法では限界があると推測される。我々は STATa タンパク質のアミノ末端を一部欠損させたものが不完全に *STATa* 遺伝子破壊株の形態を相補することを発見した。そこで、新たなスクリーニングのために、この欠損 STATa を *STATa* 遺伝子破壊株に導入しそれを常時発現している株を作製した。

この株を用いて現在までにおよそ 10 万のクローンをスクリーニングした。その中に目的とする形態が野生株に近くなるようなものがおよそ 20 クローン程得られた。これらのクローンからプラスミドを回収し、それを再び親株に導入したが形態が再び野生株に近くなるようなものは今のところ得られていない。おそらく形態の変化は cDNA プラスミドの発現によるのではなく、スクリーニング過程に生じた変異によるものと考えられる。しかしながら、たとえそのような変異であっても形態が戻るものがあるという事実は確かに STATa サプレッサーが存在することを示すものである。

4. *In situ* ハイブリダイゼーションによる STATa 標的遺伝子の同定

本研究で主眼を置く *STATa* 遺伝子はオーガナイザー領域で発現され、*STATa* 遺伝子を破壊するとオーガナイザーが形成されなくなる。これまでこの領域で発現される遺伝子はあまり調べられていなかった。そこで、新たな取り組みとしてオーガナイザー領域あるいはその近傍で特異的に発現される遺伝子の cDNA をプローブに *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、それ

らの遺伝子の野生株と *STATa* 遺伝子破壊株にける発現を比較した。その結果、13 の遺伝子について破壊株で発現が下がるかなくなることが確認され *STATa* 遺伝子によってその転写が制御されている可能性が示された。面白いことにそのうちの一つがコードするアミノ酸配列は adducin と高い相同性があり、actin 結合部位を有していた。さらにもう２つの遺伝子はセルロース結合モデュールを有する細胞外マトリックスタンパク質をコードしていた。そのうちの一つの遺伝子（*SLF308* 遺伝子）に対する破壊株を作製したところ、期待したとおり細胞の集合が遅くなり、柄の形成が異常になる等の表現型が見られた。また、adducin と高い相同性があるタンパク質をコードする遺伝子の破壊株も得られて、わずかに形態の異常が見られた。このように実際に STAT の標的遺伝子として細胞運動に関わりそうな遺伝子がとれてきたのは世界初の事例でその機能に非常に興味が持たれる。

また、欠損 STATa を発現させた実験から形態の復帰、STATa タンパク質の核移行にはわずか 18 アミノ酸からなる領域が必須であることが分かった。この領域はこれらの新規マーカー遺伝子の発現にも必要であった。このことから STATa がオーガナイザー領域特異的遺伝子の発現を調節していることが確認された。現在、オーガナイザー領域特異的遺伝子の１つについてはプロモーター領域を単離し、制御配列を同定した。

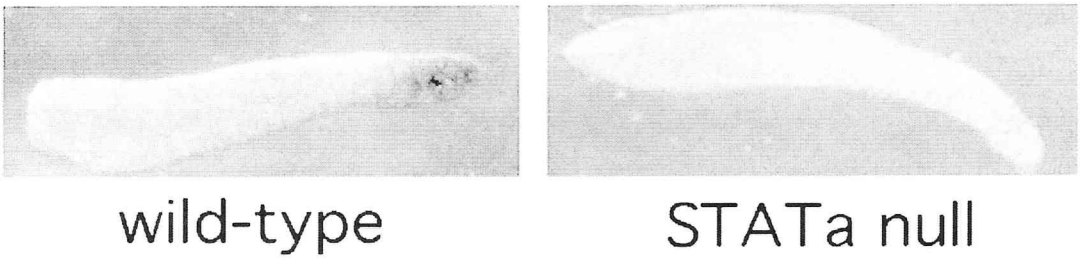

Fig. 1　Expression pattern of the *SLF308* gene of *Dictyostelium discoideum*.
Expression of the *SLF308* gene was detected by *in situ* hybridization in wild-type (left) and *statA*-null (right) strain of *Dictyostelium* slug.

考察

本研究において確立した分子遺伝学的スクリーニング法で STATa のサプレ

ッサーは未だ得られていない。しかしながら、分化に影響を及ぼす変異株（modifier mutant）の原因遺伝子として実際にSTATaと関連があることが知られているcyclic nucleotide phosphodiesterase を単離出来たことは、我々の立ち上げたこの分子遺伝学的スクリーニング法が STAT 関連遺伝子の取得に有効であることを示している。また、STATa 部分破壊株を用いたスクリーニング過程で復帰型のクローンがいくつもとれてきた事実は、たとえそれがスクリーニング過程で生じたランダムな変異によるもであっても実際に STATa サプレッサーの存在を予言するものである。現在までに行ったスクリーニングはまだ20万クローン程度で、cDNA ライブラリーの complexity が 1×10^7 であることを考えるととても十分とはいえない。上記の理由より、STATa サプレッサーの存在が確からしいので今後はこのスクリーニングをより充実させる必要がある。同時に、STATa 部分破壊株を用いて REMI を行える系を立ち上げることも急務である。

In situ ハイブリダイゼーションによる STATa 標的遺伝子の同定は非常に有効なものであった。これによって同定された遺伝子は一定の発現パターンを持つことも明らかになった。また、同定された遺伝子が細胞外マトリックスタンパク質をコードしていたことは、細胞外マトリックスが細胞運動の制御に関わっているという事実から、STAT がどのようにして細胞運動を制御しているのかというメカニズムにヒントを与えるものである。

STAT によって制御されている細胞運動には主に上皮細胞が細胞間結合を解除し、遊走能を持った間葉細胞に変換する Epithelial-mesenchymal transition (EMT)を介して引き起こされることが知られている。EMT に細胞外マトリックスが重要な働きをしていることは従来知られていたが、今年になって、STAT による EMT に Rho ファミリーGTPase の RhoA が関与しているという報告があった。しかしながら、EMT の詳細なメカニズムは依然として未知の部分が多く残されている。今後の研究の発展は STAT や Rho ファミリーGTPase および細胞外マトリックスを介した EMT の分子メカニズムの解明に寄与し、癌医療や再生医療にも多大な貢献があると期待できる。

研究発表

口頭発表

1. 大畠明子、川田健文　*D. discoideum* における分泌性の分化誘導因子

第４回細胞性粘菌研究会 東京、2002 年 3 月

2.島田奈央、片桐善一郎、福沢雅志、前田ミネ子、川田健文
In situ hybridisation を利用した STATa 標的遺伝子の検索
第５回細胞性粘菌研究会 東京、2003 年 3 月

3.南澤　洋、島田奈央、大畠明子、川田健文
細胞性粘菌の増殖因子（psi 因子）による分化特異的遺伝子の発現制御　第５回細胞性粘菌研究会 東京、2003 年 3 月

4. Zhukovskaya, N.V., Fukuzawa, M., Tsujioka, M., Jermyn, K.A., Kawata, T. and Williams, J.G.
Dd-STATb, a *Dictyostelium* STAT protein with a highly unusual SH2 domain, is a regulator of cell growth and early development. International Slime Mold Meeting, Lorne, Australia, June/July 2003.

5. Minamisawa, H., Shimada, N., Kawata, T. and Oohata, A.A.
A novel growth factor (psi factor) regulates cell-specific gene expression in *Dictyostelium discoideum*. International Slime Mold Meeting, Lorne, Australia, June/July 2003.

6. Shimada, N., Katagiri, Z., Fukuzawa, M., Maruo, T., Williams, J.G., Maeda, M. and Kawata, T.
A serach for STATa target genes and analysis of a STATa activation domain by use of *in situ* hybridisation. International Slime Mold Meeting, Lorne, Australia, June/July 2003.

7. 島田奈央、丸尾俊也、福沢雅志、Jeffrey Williams, 前田ミネ子、川田健文　細胞性粘菌 STATa 標的遺伝子の検証について　日本植物学会第 67 回大会 札幌、2003 年 9 月

誌上発表

1. Kawata, T., Nakagawa, M., Shimada, N., Fujii, S., Oohata, A. A. (2004)
A gene encoding prespore-cell-inducing factor in *Dictyostelium discoideum* that is a novel type of growth factor. Submitted.

2. Shimada, N., Maeda, M., Urushihara, H., Kawata, T. (2004)
Extracellular matrix protein, a putative target of STATa, controls cell motility

in *Dictyostelium discoideum*. In preparation.

3. Shimada, N., Maruo, T., Maeda, M., Kawata, T. (2004)
Identification of pstAB-specific regulatory elements of *Dictyostelium* propionate-CoA ligase gene promoter. In preparation.