

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	がん細胞の増殖を促進する転写因子の不活性化機構に関する構造機能研究				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・講師	氏名	菱木 麻美
	研究分担者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	薬学部・講師	氏名	菱木 麻美

講演題目	TC45により脱リン酸化されて不活性化するリン酸化 STAT3 の調製方法の検討
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>がんをはじめとする多くの疾患は、シグナル伝達の制御破綻に起因している。これらの異常を解明するためには、シグナル伝達系の個々の構成因子だけではなく、それらの相互作用を詳細に理解する必要がある。STAT3 は多様な細胞外刺激により活性化される転写因子であり、その活性化には、705番目のチロシン残基(Y705)がリン酸化され二量体を形成することが不可欠である。細胞質でリン酸化され活性化した STAT3(pSTAT3)は核内に移行し、細胞を増殖させる Cyclin D1 や細胞死抵抗性を示す Bcl-2 などの遺伝子の転写を促進する。STAT3 は固形がんの 70%で異常に活性化しており、がん細胞の増殖、浸潤、転移などを引き起こすことが知られている。TC45 は pSTAT3 の脱リン酸化酵素である。TC45 は SUMO 相互作用モチーフを持ち、K451 が SUMO 化された pSTAT3 を脱リン酸化して STAT3 の二量体構造を不安定化させる。そのため、pSTAT3 と TC45 の複合体構造を安定化することは、がん細胞の増殖を抑制することが予想され、新しいがん治療戦略を創成する単著となり得る。本研究は、pSTAT3 と TC45 の複合体での X 線結晶構造解析を目的とし、今年度は pSTAT3 と TC45 の複合体を調製するための、pSTAT3 の調製方法を検討した。</p> <p>pSTAT3 の発現は、リン酸化されたタンパク質を産生する大腸菌宿主 TKB1(DE3)を用いた。pET ベクターに STAT3(127-722)を導入し、His タグ融合タンパク質として発現するためのプラスミドを作製した。また、リン酸化状態を調べるため、非リン酸化 STAT3(122-722)を発現する宿主として大腸菌 BL21(DE3)を用いた。また、Y705 のリン酸化を調べるため、Y705 に点変異を導入した His-STAT3(122-722, Y705A), His-STAT3(122-722, Y705F) の発現ベクターを作製し、誘導温度、誘導時間などの条件を検討した。得られた大腸菌の可溶性画分から His-STAT3 をアフィニティービーズで粗精製し、Phos-tag SDS-PAGE により STAT3 のリン酸化状態を調べた。TKB1(DE3)または BL21(DE3)を用いて発現させた His-STAT3(122-722)を比較したところ、Phos-tag SDS-PAGE で異なる挙動を示し、His-STAT3(122-722)が TKB1(DE3)内でリン酸化されていることを確認した。一方、Y705 に変異を導入した His-STAT3(122-722, Y705A), His-STAT3(Y705F)においても BL21(DE3)で発現させた His-STAT3(122-722)とは異なる挙動を示したことから、Y705に加えて他のチロシン残基もリン酸化されている可能性が示唆された。ウェスタンブロッティングを用いて調べた結果も同様であった。今後は、現在得られているリン酸化 STAT3(122-722)を用いて TC45 との相互作用を確認するとともに、STAT3(122-722)の Y705 以外のリン酸化部位を調べる予定である。</p>