

サイトカイン依存的なリンパ球増殖の制御におけるDaxxの役割

室本 竜太 [北海道大学大学院薬学研究院／助教]

背景・目的

Daxx はアポトーシス誘導機能をもつことが知られるタンパク質であり、リンパ球の生存抑制に関与することが示唆されている。しかし Daxx がアポトーシスを促進する分子機構には不明な点が多い。これまでにわれわれは、Daxx がシグナル伝達性転写因子 Stat3 の機能を抑制する機能をもつことを報告した。Stat3 はインターロイキン 6(IL-6)などのサイトカイン刺激によって活性化され、標的遺伝子の転写を誘導して細胞の増殖を促進する。本研究では、Stat3 機能に依存して増殖するプロ B 細胞株を用いて解析を行い、Daxx によるアポトーシス促進の新たな分子機構を明らかにすることを目的とした。

内容・方法

IL-3 依存性マウスプロ B 細胞株 BaF-B03 細胞由来のトランسفエクタントである、BaF-G133 細胞という細胞株を実験に用いた。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り、G-CSF 刺激によるキメラ受容体の 2 量体化により、細胞内で gp130 からのシグナル伝達系が活性化され、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 に依存していることが報告されており、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。細胞増殖について WST8 試薬を用いた比色法で解析した。細胞周期を PI 染色法及びフローサイトメーターを用いて解析した。アポトーシス抑制タンパク質である Bcl-2 の発現量について mRNA 量を半定量的 RT-PCR 法、タンパク質の量をウエスタンプロット法で解析した。

結果・成果

BaF-G133 細胞を IL-3 非存在下に G-CSF 刺激で刺激することによって、Stat3 リン酸化(活性化)、細胞増殖等が誘導されること、また Stat3 のドミナントネガティブ型変異体の発現によってこれらの応答が阻害されるることは報告されており、当研究室での予備実験でも確かめられていた。また BaF-G133 細胞に siRNA を導入すると Daxx タンパク量の減少をウエスタンプロット法で確認した。さらに、Daxx 発現プラスミドを導入した後、薬剤による選別を行い、Daxx を過剰発現する細胞株(BaF-G133/Daxx)を樹立した。これらの細胞を用いて G-CSF 刺激による細胞増殖(Stat3 依存的細胞増殖)につい

て WST8 試薬を用い測定した。その結果、一過性の Daxx ノックダウンによって Stat3 依存的に増殖/生存した細胞数は増加した。BaF-G133/Daxx では減少した。一方で、BaF-G133 細胞の IL-3 刺激による増殖(MAPK 経路や Stat5 の寄与度が大きいと報告されている)には、Daxx ノックダウンや過剰発現による影響がわずかにしか認められなかった。この結果から BaF-G133 細胞において Daxx は Stat3 依存的な細胞増殖/生存を特異的に抑制することが示された。

BaF-G133 細胞において活性化した Stat3 は細胞周期を G₁/G₀ 期から S 期へと進行させる役割をもつと報告されていることから、PI 染色法による細胞周期解析を行った。IL-3 不含の培地に置換して増殖を停止させ細胞周期を G₁/G₀ 期に同調させた後、G-CSF を培地に添加すると 12 時間後に S 期にある細胞の割合が増加する。この実験系を用いて、BaF-G133 細胞と BaF-G133/Daxx で細胞周期の進行を比較したが、G-CSF 刺激 12 時間後に観察される S 期割合の増加は Daxx 過剰発現による影響が認められなかった。一方、BaF-G133/Daxx において細胞死の指標とされる subG₁ ピークの増加が観察された。これらの結果から、BaF-G133 細胞において Daxx は細胞死を促進することで生存細胞数を減少させており、細胞周期進行を遅延させるわけではないことが示唆された。

海外のグループの研究から Daxx がアポトーシス抑制タンパク Bcl-2 の遺伝子発現を抑制しうることが、一過性過剰発現系のレポーターアッセイで示されていた。このことから BaF-G133 細胞において、Daxx が内在性 Bcl-2 の遺伝子発現を抑制している可能性が考えられた。そこで BaF-G133 細胞と BaF-G133/Daxx における Bcl-2 発現量の解析を行ったところ、BaF-G133/Daxx では Bcl-2 の mRNA 量とタンパク量が共に減少していた。また siRNA を用いた Daxx ノックダウンによって Bcl-2 の mRNA 量が増加することも観察された。他の Bcl-2 ファミリーの mRNA 量は Daxx 過剰発現によって変動が認められなかったことから、BaF-G133 細胞において Daxx は Bcl-2 の発現量を特異的に抑制することが示唆された。さらに、細胞増殖試験で BaF-G133/Daxx にみられる生存細胞数減少は、Bcl-2 発現プラスミドを導入して一過性に過剰発現させることにより回復した。以上から BaF-G133 細胞において Daxx は Bcl-2 量を減少させることによってアポトーシスを促進することが強く示唆された。

今後の展望

Daxx が内在性 Bcl-2 の発現量制御にどのように関与するか、その詳細が不明である。本研究では Daxx の過剰発現によって Bcl-2 の mRNA 量が減少することを示した。Daxx はヒストン脱アセチル化酵素と会合して転写抑制機能をもつこと、また Bcl-2 遺伝子の転写を促進する転写因子 NF-kB や STAT3 の機能を抑制すると報告

されていることから、Daxx が Bcl-2 の発現を転写レベルで抑制している可能性がある。そこで、クロマチン免疫沈降法による解析を行うことで Bcl-2 プロモーター上流の転写調節領域への Daxx の会合や周辺ヒストンのアセチル化の状態について明らかにすることで、アポトーシス誘導における Daxx の役割がさらに明確となると考えられる。