The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	インターフェロンーβ（INFーβ）遺伝子の転写制御機構 : 転写因子Interferon Regulatory Factor-1（IRF-1）遺伝子の構造と発現調節
Author(s)	伊東, 進
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37055
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【1】

氏名・(本籍)	伊東　進（いとう　すすむ）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第　9138　号
学位授与の日付	平成2年3月24日
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**インターフェロン－β（IFN－β）遺伝子の転写制御機構 －転写因子 Interferon Regulatory Factor－1（IRF－1）遺伝子の構造と発現調節－**
論文審査委員	(主査) 教授　三村　務 (副査) 教授　真弓　忠範　　教授　西原　力　　教授　谷口　維紹

論文内容の要旨

サイトカインの一つであるβ型インターフェロン（IFN－β）は，主に線維芽細胞において，ウィルスやdouble strand RNA等の刺激によって一過的にその遺伝子の発現が誘導される。合成，分泌されたIFN－βは，特異的な細胞膜上のレセプターを介して，そのシグナルを細胞内に伝達し，増殖や分化などの様々な生理活性を示す。藤田らは，ウイルスによるIFN－β遺伝子の発現が転写レベルで調節されていることを既に報告している。

最近，宮本らによってIFN－β遺伝子の転写を正に制御しているDNA結合タンパク質であるinterferon regulatory factor－1（IRF－1）及び原田らによってIRF－1と相同性がありIFN－β遺伝子の転写を抑制していると考えられているIRF－2をそれぞれコードするcDNAが共にマウスL929細胞から単離された。

本研究においては，マウスでクローニングされたIRF－2 cDNAのcounterpartとしてヒトIRF－2 cDNAを単離し，さらにIFN－β遺伝子の転写を正に制御しているヒトIRF－1に関して，その遺伝子の構造と転写調節機構を検討した。

最初にヒトJurkat－111細胞mRNAより調製したcDNAをCDM8 vectorに挿入し，cDNAライブラリーを作製した。マウスIRF－2 cDNAをプローブに用い，2.5×10^5コロニーをスクリーニングし，1個の陽性クローンであるpHIRF4S－51を得た。pHIRF4S－51の塩基配列を決定し，アミノ酸レベルでのhomologyを解析したところ，マウスIRF－2との相同性は約93.5％であり，ヒトとマウス間でIRF－2は非常によく保存されていることがわかった。さらに，ヒトIRF－1とIRF－2との相同性はN末端113アミノ酸において73％であった。

次に，ヒトＩＲＦ－１遺伝子を単離する目的で，ヒトgenomic DNAをAluI−HaeＩＩＩ partial digestionし，Charon ４Ａに挿入して得たファージライブラリーから1×10^6プラークをスクリーニングし，７個の陽性クローンを得た。その中の１つのクローンであるλHuＩRF1Bは，ヒトＩRF−1 cDNAであるpHＩRF31の全塩基配列を含んでいることがサザンブロット解析により明かとなった。そこで以後の解析には，λHuＩRF１Bを用いることにした。ＩRF−1 遺伝子は，１０個のエクソンに分かれており，約８kb にわたってエクソンが散在していた。第１エクソンは，5’非翻訳領域であり，第２エクソンに，initiation codon であるＡＴＧが存在し，第１０エクソンにtermination codonである，TGAが存在していた。

ＩRF−1 遺伝子の染色体マッピングは，マウス−ヒトハイブリッド細胞を用いたサザンブロッテイング解析により，第５染色体に位置することが明かとなった。また，RFLP（restriction fragment length polymorphism)によるlinkage analysisにより，ＩRF−１遺伝子が，５q23−31に位置することを認めている（未発表データ）。

ＲＮＡブロッテング解析の結果，ＩＲＦ−１ mRＮＡはＮＤＶ（Newcastle Disease Virus），ＩＦＮ−βおよびＰＨＡ／ＰＭＡにより一過性に増大した。そこで，このmRNA の一過性の増大が転写レベルで制御されているか否かを検討した。まず，ＩＲＦ−１遺伝子の５’上流の塩基配列を決定したところ，ＩＲＦ−１遺伝子の5’上流−４９３までには，非常に多くの既知の転写制御因子の認識配列を認めた。

そこで，ＩＲＦ−１遺伝子の上流にＣＡＴ（chloramphenicol acetyltransferase）遺伝子を連結した５種類のdeletion mutantを作製し，これらのプラスミドをJurkat細胞にトランスフェクションし，ＣＡＴassay を行なった。ＰＨＡ／ＰＭＡ刺激により5’上流−２１６までを含むキメラプラスミドは，転写レベルを著しく増大させた。

次に，Ｌ９２９細胞にキメラプラスミドとネオマイシン耐性遺伝子のpSTneoB とを遺伝子導入し，形質転換細胞を得た。これらの形質転換細胞を１００コロニーずつプールし実験に用いた。それぞれの形質転換細胞をＮＤＶ，ＩＦＮ−βおよびＴＮＦにより刺激した後，全ＲＮＡを個々の細胞群より調製し，S1 mapping解析を行なったところ，ＮＤＶ刺激によりp−3500ＩRFcat，p−493ＩRFcatおよびp−216ＩRFcat は，それぞれ細胞当り200,56および24 コピーのmRＮＡが転写された。ＩＦＮ−β刺激においては，それぞれ細胞当り１3.6，6.5および１コピーのmRＮＡが転写された。また，ＴＮＦ刺激では細胞当り6.9，４および0.6コピーのmRＮＡが転写された。一方p−143ＩRFcat及びp+8ＩRFeatでは，すべての刺激においてmRＮＡは検出されなかった。

ＩＲＦ−１遺伝子の上流−216までには，NDV感染により転写誘導されるDNA配列が存在することが判った。そこで上流−216までのDNA領域のどの配列がウィルス誘導に必要であるかを検討した所，非常に興味深いことにNDVで誘導されることが知られている転写制御因子ＮＦ−ｋＢの認識配列がＩＲＦ−１遺伝子の上流−47から−38に存在することがわかった。そこで，このDNA配列に実際ＮＦ−ｋＢ（ＮＦ−ｋＢlike factor）が結合できるか否かをゲルシフト法により解析した。その結果，このDNA領域には，NDV感染により強く誘導されるタンパク質を同定した。さらに，このタンパク質は，Sen

and Baltimore, Baeuerle and Baltimore によって報告されたものと同様の性状を有することが認められ，NF−kB（NF−kB1 ike factor）が結合しているものと考えられた。

そこで，このDNA領域にmutationを入れることにより転写レベルがどの様に変化するかを検討した。S1 mapping解析の結果，p−216 IRFcat は，NDV刺激により，細胞当り24コピーのmRNAの転写が認められたが，NF−kB（NF−kB 1ike factor）認識配列に変異を入れたp−216 IRFmNF catでは，その転写が細胞当り6コピーと約¼に減少した。

以上をまとめると，1）ヒトIRF−2 cDNAを単離した所，マウスIRF−2とアミノ酸 レベルで約93.5％の相同性を見いだし，またヒトIRF−1とIRF−2間においてN末端113アノ酸までに約73％の相同性を見つけた。2）IRF−1遺伝子は，10個のエクソンから成っており，5q23−31 にマップされることが判った。3）IRF−1遺伝子の上流−216までは，PHA/PMA，NDV，IFN−βおよびTNF 刺激による転写誘導を引き起こす領域を含んでいることが認められた。この転写誘導能は，上流領域が短くなるにつれて弱くなった。4）転写制御因子NF−kB like factorがIRF−1 遺伝子のNDV感染による転写活性化に必要であることが判った。

論文の審査結果の要旨

本研究はINF−β遺伝子の転写制御機構を解明するべくマウスIRF−2 cDNAをプローブとしてヒトIRF−2を単離し，さらにINF−β遺伝子の転写を正に制御しているIRF−1 遺伝子の構造と発現調節をしらべたものである。その結果，通常の状態ではINF−β及びIRF−1遺伝子転写は全くおこっていないが，細胞をウィルス感染させるとまずIRF−1遺伝子の5′上流にNF−kBが結合し，IRF−1遺伝子の転写がおこり，IRF−1がつくられる。そしてそれにつづいてINF−β遺伝子の上流に結合しているIRF−2におきかわってIRF−1が結合し，さらにNF−kBも結合することによりIFN−β遺伝子の転写がおきることを明らかにしたもので，学位論文として価値あるものと認められる。