

Title	インターフェロン $\beta$ (INF- $\beta$ ) 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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37055">https://hdl.handle.net/11094/37055</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・(本籍)	い	とう	すすむ
学位の種類	伊	東	進
学位記番号	薬	学	博 士
学位授与の日付	第	9 1 3 8	号
学位授与の要件	平成 2 年 3 月 24 日		
学位論文題目	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当 インターフェロン- $\beta$ (IFN- $\beta$ ) 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 $\beta$ 型インターフェロン (IFN- $\beta$ ) は、主に線維芽細胞において、ウイルスや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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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、 $2.5 \times 10^5$  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 4 A に挿入して得たフェージライブラリーから  $1 \times 10^6$  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  $\lambda$  Hu IRF1B 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らかとなった。そこで以後の解析には、 $\lambda$  Hu IRF1B 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 8 kb 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ト解析により、第 5 染色体に位置することが明らかとなった。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 ブロットング解析の結果、IRF-1 mRNA は NDV (Newcastle Disease Virus)、IFN- $\beta$  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 5' 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、CAT assay 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 pS TneoB 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- $\beta$  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-3500 IRFcat、p-493 IRFcat および p-216 IRFcat は、それぞれ細胞当たり 200,56 および 24 コピーの mRNA が転写された。IFN- $\beta$  刺激においては、それぞれ細胞当たり 13.6、6.5 および 1 コピーの mRNA が転写された。また、TNF 刺激では細胞当たり 6.9、4 および 0.6 コピーの mRNA が転写された。一方 p-143 IRFcat 及び p+8 IRFcat 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 5' 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 5' 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- $\kappa$ B の認識配列が IRF-1 遺伝子の 5' 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- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B like 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- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B like 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よう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、細胞当たり 24 コピーの mRNA の転写が認められたが、NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B like factor) 認識配列に変異を入れた p-216 IRFmNFcat では、その転写が細胞当たり 6 コピーと約 1/4 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% の相同性を見だし、またヒト IRF-1 と IRF-2 間において N 末端 113 アミノ酸までに約 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- $\beta$  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- $\kappa$ B 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 IFN- $\beta$  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 IFN- $\beta$  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 IFN- $\beta$  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- $\kappa$ B 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 IFN- $\beta$  遺伝子の 5' 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- $\kappa$ B も結合することにより IFN- $\beta$  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。