



Title	Augmentation of haptoglobin production in Hep 3 B cell line by a nuclear factor NF-IL 6
Author(s)	長束, 俊治
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37959
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

氏名	長 束 俊 治
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 1 5 2 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 生理系専攻
学位論文名	Augmentation of haptoglobin production in Hep 3 B cell line by a nuclear factor NF-IL 6 (核内因子 NF-IL 6 による Hep 3 B 細胞株でのハプトグロビン産生の増強)
論文審査委員	(主査) 教 授 平野 俊夫 (副査) 教 授 岸本 忠三 教 授 谷口 維紹

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

転写因子 NF-IL 6 は、IL 6 を誘導する転写活性化因子として単離された。さらにこの NF-IL 6 は肝細胞でも IL-6 刺激によって発現することや、幾つかの急性期蛋白質遺伝子上流に NF-IL 6 結合可能部位の存在が報告されていることから、IL-6 による急性期蛋白質の誘導に NF-IL 6 が関わっている可能性が示唆されている。そこで本研究は、肝癌細胞株 Hep 3 B で NF-IL 6 を強制過剰発現させて急性期蛋白質の産生への影響を調べ、NF-IL 6 の急性期蛋白質誘導に対する役割について検討を加えることを目的とした。

(方 法)

- 1) Hep 3 B 細胞への NF-IL 6 遺伝子の導入と発現 : NF-IL 6 遺伝子とその N 末端欠損ミュータント遺伝子を動物細胞発現ベクター-BCMGNNeo に挿入し、エレクトロポレーション法を用いて Hep 3 B 細胞に導入した。この N 末端欠損ミュータントは DNA 結合活性は持つが転写活性は持たないことが既に知られている。そして抗生物質 G 418 に対する抵抗性を利用して安定形質転換株を得た。ベクターだけの導入株、NF-IL 6 導入株、N 末端欠損ミュータント導入株を各々 Hep/BC, Hep/NF, Hep/del と名付けた。導入遺伝子の発現を確認するために、導入細胞の核抽出液を SDS-PAGE に掛けた後、抗 NF-IL6 ペプチド抗血清によるウェスタンブロッティングを行った。その結果、Hep/NF では 44 KDa と 42 KDa に、Hep/del では 25 KDa と 22 KDa に各二本ずつの特異的なバンドが検出された。
- 2) 急性期蛋白質の産生量測定 : 各々 9 クローンの Hep/BC, Hep/NF, Hep/del を 1×10^6 個ずつ 6

cm の培養皿にまいた後、IL-6 存在下または非存在下に於て48時間培養した。それらの培養上清中に分泌されたハプトグロビン、アルブミン、フィブリノーゲンの量をサンドイッチ ELISA 法によって測定した。9 クローンの平均値を求め、Hep/BC, Hep/NF, Hep/del 間の相違を検討した。

- 3) NF-IL 6 の DNA 結合活性測定：IL-6 刺激によるハプトグロビン遺伝子の誘導に最も重要である cis- エLEMENT が、既に Cortese 等によって同定されており、HpC (ハプトグロビン・サイト C) と名付けられている。この HpC のオリゴ DNA を合成し、末端をビオチン化した後、Hep/BC, Hep/NF, Hep/del の各核抽出液に加えて反応させた。固相化ストレプトアビジンを用いて Hp C オリゴ DNA とその結合蛋白質を回収し、SDS-PAGE に掛けた後、抗 NF-IL 6 抗血清を用いてウェスタンブロッティングを行った。こうして、強制発現させた NF-IL 6 が、HpC ELEMENT 結合能を持つかどうかを調べた。

(成 績)

- 1) ハプトグロビンの発現：急性期蛋白質の一つであるハプトグロビンは IL-6 刺激によって劇的な誘導を受ける。今回用いた Hep 3 B 細胞の系でも数十倍～百倍の誘導を受けた。NF-IL 6 を強制過剰発現させた Hep/NF では、対照の Hep/BC に比べて、約 8 倍のハプトグロビン産生量の増加が、一方、Hep/del では対照に比べて IL-6 非存在下で約 40%、存在下で約 60% の産生量の減少が観測された。さらに、これらの細胞株中に強制発現させた NF-IL 6 と N 末端欠損 NF-IL 6 は共に、ハプトグロビン遺伝子の発現調節 ELEMENT HpC に結合できることを示した。しかし、IL-6 非存在下の Hep/NF は、存在下の Hep/BC に比べてハプトグロビンの産生量が約 10 分の 1 であったので、NF-IL 6 の強制発現だけでは最大限の誘導には不十分であることが考えられた。すなわち IL-6 によるハプトグロビンの誘導には、NF-IL 6 の修飾による活性化あるいは他の分子の関与も必要であることが示唆された。2) フィブリノーゲンとアルブミンの発現：フィブリノーゲンとアルブミンの産生量共、Hep/NF と Hep/BC の間で有為な差は認められなかったが、Hep/del では Hep/BC に比べて明かな産生量の減少が認められた。このことは、NF-IL 6 自身はフィブリノーゲンとアルブミンの遺伝子に対して強い転写活性化能を持たないが、その結合部位はこれらの急性期蛋白質の転写活性化に重要であることを示唆している。

(総 括)

- 1) 肝癌細胞株 Hep 3 B において NF-IL 6 を強制過剰発現させることによって、急性期蛋白質の一つであるハプトグロビンの産生が増強された。一方、N 末端欠損 NF-IL 6 の強制発現株ではその産生は抑制されていた。またこれら強制発現させた NF-IL 6 及び N 末端欠損 NF-IL 6 は、ハプトグロビン遺伝子の発現調節 ELEMENT (HpC) に結合できた。以上のことから、NF-IL 6 は実際に肝細胞に於て、ハプトグロビン遺伝子の転写活性化因子として働いていることが強く示唆された。2) N 末端欠損 NF-IL 6 発現株では、アルブミンとフィブリノーゲンの産生も抑制されたことから、NF-IL 6 の結合する DNA ELEMENT がこれらの遺伝子の発現にも関わっていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、転写因子 NF-IL 6 の急性期蛋白質誘導能について、NF-IL 6 を肝癌細胞株で強制過剰発現させることによって検討したものである。

転写因子 NF-IL 6 はインターロイキン 6 刺激によって肝細胞で急性期蛋白質に先行して誘導されることや、幾つかの急性期蛋白質遺伝子の発現調節領域に NF-IL 6 の結合可能な部位の有ることが知られていた。しかし、実際に NF-IL 6 がそれらの遺伝子の転写活性化能を持つか否かは確かめられていなかった。そこで本研究では、NF-IL 6 を肝癌細胞株 Hep 3 B で強制過剰発現させて、急性期蛋白質の誘導に及ぼす影響が調べられた。その結果、急性期蛋白質の一つであるハプトグロビンの産生が顕著に増強されることが示された。この結果、転写因子 NF-IL 6 が肝細胞において実際にハプトグロビン遺伝子の活性化に係わっていることを強く示唆するものである。

以上、本研究は転写因子 NF-IL 6 の生理的意義を知る上で意義深いものであり、博士（医学）の学位論文として十分価値あるものと認める。