

Title	ウイルスによるインターフェロン遺伝子活性化の機構
Author(s)	榊原, 順
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37972">https://hdl.handle.net/11094/37972</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 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	さかき ばら じゅん 榊 原 順
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 10149 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	ウイルスによるインターフェロン遺伝子活性化の機構
論文審査委員	(主査) 教 授 谷口 維紹 (副査) 教 授 岡山 博人 教 授 遠山 正彌

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目 的)

インターフェロン (IFN) は抗ウイルス作用をもつサイトカインの一種であり、通常の細胞ではほとんどが産生されていないが、ウイルス感染等の刺激によって転写レベルで一過的に誘導が起こる。IFN- $\beta$  遺伝子の転写開始点の上流には、ウイルスによる転写誘導に必要な領域が存在し、その領域に結合する 2 つの転写因子 Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1) および IRF-2 が同定されている。通常、細胞内には IRF-2 が優位に存在し transcriptional repressor として作用しており、ウイルス感染によって activator である IRF-1 が誘導され IFN 遺伝子の転写が活性化されると考えられている。しかしながら、IFN や TNF 処理によっても IRF-1 が誘導されるにも関わらず、これらの刺激によっては IFN 遺伝子の効率的な活性化は起こらない。このことは、ウイルスによる IFN 遺伝子の転写誘導には IRF-1 が誘導されることに加えてさらに何らかの転写活性化促進の機構が存在することを示唆している。具体的には IRF-1 がタンパクのリン酸化を含む修飾を受け活性化される、ないし付加因子が働く等の機構が考えられる。

そこでウイルス誘導時における特異的な転写活性化促進のメカニズムを明かにする目的で以下の実験を行った。

### (方法と結果)

ウイルス感染特異的に出現する因子を同定するためにマウス L929 細胞を用い細胞抽出液の調製法やゲルシフト法の条件を検討した。その結果、IFN や TNF 処理といった IFN 遺伝子の転写が誘導されない処理をした細胞には検出できないが、ウイルス感染した細胞や priming (IFN 処理) 及び polyI:poly

C 処理した細胞等 IFN 遺伝子の効率的に転写が誘導されている細胞に、特異的に現われる誘導特異的因子を見いだした。IRF が効率的に結合する AAGTGA の 4 回繰返しを含む配列 (C1 オリゴマー) をプローブとして用いた。この誘導特異的因子はそのバントの強度が IFN- $\beta$  遺伝子の発現レベルと相關していた。

つぎにウイルス感染ないし priming 及び polyI:polyC 処理をした後、経時的に細胞抽出液を調製しゲルシフトアッセイを行ったところ、誘導特異的因子の出現は IFN- $\beta$  遺伝子の発現と一致していることがわかった。これらの結果から、この誘導特異的因子は IFN- $\beta$  遺伝子の転写活性化に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

次にこの誘導特異的因子の分子量を調べた。L929 細胞抽出液を 5% から 30% の glycerol gradient を用いて分画し、それぞれの分画を用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果この誘導特異的因子は分子量がおおよそ 90 kD であり、IRF のほぼ 2 倍の分子量であることが判明した。

次にこの因子に IRF が含まれているかどうかを調べるため細胞抽出液を抗 IRF-1 抗体および抗 IRF-2 抗体で処理した後ゲルシフトアッセイを行った。その結果抗 IRF-2 抗体がこの因子と反応した。このことからこの因子に IRF-2 が含まれていると考えられた。

さらにこの因子に IRF-1 が関わっているかどうか調べるため次のような実験を行った。IRF-1 もしくは IRF-2 の発現ベクターを L929 細胞に導入し、48 時間後にタンパク質合成阻害剤である cycloheximide 存在下でウイルス感染させた。この実験では導入遺伝子によって発現された IRF が細胞内に蓄積した状態で新たなタンパク合成を止め、タンパク合成を必要としない修飾のシグナルを受けた変化を調べることができる。その結果、IRF-1 を導入した時のみこの誘導特異的因子を検出することができた。このことから誘導特異的因子の形成には IRF-1 が必要であることが示された。これらの結果からこの誘導特異的因子は IRF-2 を含み IRF-1 自身もしくは IRF-1 により誘導されるタンパクを含んでいることが示唆された。なかでも IRF-1 と IRF-2 が hetero-dimer を形成している可能性がある。

最後にこの因子の様々な配列に対する親和性を調べた。様々な DNA 配列を competitor として加えゲルシフトアッセイを行い、誘導特異的因子と C1 プローブの結合を阻害する程度によって親和性を比較した。その結果ウイルス感染による高い転写誘導活性を持つ配列である C1 オリゴマーや IFN- $\beta$  遺伝子上流配列に対しては誘導特異的因子の方が IRF より親和性が高かった。また C1 オリゴマーよりも低い転写誘導活性を持つ AAGTGA の 3 回繰返しを含む配列 (C13 オリゴマー) に対しては誘導特異的因子も IRF も必要な competitor 量は変わらなかった。この結果誘導特異的因子は IRF よりも IFN 遺伝子上流配列に対する親和性が高く、IFN 遺伝子の転写をより活性化しやすいと考えられる。

#### (総括)

以上の結果から IFN 遺伝子の転写誘導機構について次のようなモデルが考えられる。通常の細胞において repressor である IRF-2 が IFN 遺伝子上流に結合しその発現を抑えている。一方ウイルス感染時には activator である IRF-1 が誘導されると共に、何らかの構造変化を起こすシグナルにより IRF-1 および IRF-2 が hetero-dimer を形成する。そして IFN 遺伝子上流配列に対する親和性が高くなることにより IRF-2 と置き替わり、IFN 遺伝子の転写活性化を引き起こす。

## 論文審査の結果の要旨

抗ウイルス因子として知られるインターフェロン (IFN) は細胞がウイルス感染を受けると効率よく生産されるが、その時 IFN 遺伝子の一過性の転写活性化が引き起こされる。非感染時の細胞では IFN 遺伝子は抑制因子 IRF-2 によってネガティブな制御を受けている。本研究においては  $\beta$  型インターフェロン (IFN- $\beta$ ) 遺伝子の転写制御機構の解析を行う中で、効率的な転写誘導時に特異的に現われる因子を見いだした。更にこの因子は IRF の単量体よりも IFN- $\beta$  遺伝子上流の制御配列にたいする親和性が高いことも見いだした。また転写活性化因子 IRF-1 及び IRF-2 が強発現している細胞を用いて、この細胞が IRF-1 と IRF-2 が協調して IFN- $\beta$  遺伝子の転写活性化を引き起こすというモデルを提唱し、また実証可能であることを示した。これらの研究は、転写因子 IRF-1 及び IRF-2 が転写活性化を引き起こす際のメカニズムの解明に多大な貢献をしたものであり、博士論文に充分値するものである。