

Title	A member of the C/EBP family, NF-IL6 $\beta$ , forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6
Author(s)	木下, 茂美
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38121">https://hdl.handle.net/11094/38121</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	木下茂美
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第10633号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	A member of the C/EBP family, NF-IL 6 $\beta$ , forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL 6 (C/EBPファミリーのメンバーであるNF-IL 6 $\beta$ とNF-IL 6のヘテロダイマー形成と転写活性における相乗効果)
論文審査委員	(主査) 教授 上田 重晴 (副査) 教授 岸本 忠三 教授 平野 俊夫

## 論文内容の要旨

## (目的)

IL-6は生体防御反応において中心的役割を担う多機能性サイトカインである一方、その異常産生は各種疾患の病因、病態に関与している。IL-6遺伝子発現調節機構を解明することはこれらIL-6発現異常により生じる疾患の発症を分子レベルで解明するうえで重要である。すでにIL-1刺激によるIL-6遺伝子発現に関与する因子としてNF-IL 6遺伝子をクローニングしている。本研究では、IL-6遺伝子発現機構をより詳細に理解するために、NF-IL 6関連遺伝子としてNF-IL 6  $\beta$ をクローニングしその性質と、転写におけるNF-IL 6  $\beta$ とNF-IL 6の相互作用について解析を行った。

## (方法ならびに成績)

## 1. NF-IL 6関連遺伝子のクローニング

NF-IL 6のDNA結合領域をプローブとして用いたヒト遺伝子ライブラリーをスクリーニングし陽性クローンHPG 13を得た。次にHPG 13のcDNAを得るためにHPG 13の挿入DNAをプローブとして用いたヒト肺 $\lambda$ gt11 cDNAライブラリーをスクリーニングしノーザンブロット解析により予想された遺伝子の全長をコードするcDNAを得た。そしてこのcDNAがコードする蛋白をNF-IL 6  $\beta$ と名付けた。NF-IL 6  $\beta$ は269アミノ酸残基からなる分子量28.4kDaの蛋白でC末側にbZIPファミリーに特徴的なDNA結合領域とロイシンジッパー領域を有していた。また、NF-IL 6  $\beta$ とNF-IL 6またはC/EBPは、それぞれのDNA結合領域及びロイシンジッパー領域において高いアミノ酸相同性を示したが、N末領域は全く異なっていた。

2. NF-IL 6  $\beta$ のDNA結合に対する特異性の解析

NF-IL 6  $\beta$ のDNA結合に対する特異性はIL-6遺伝子5'上流域をDNAプローブとして用いたcompetition gel shift assayにより解析した。その結果、NF-IL 6  $\beta$ はCCAATホモロジーを含む急性期蛋白遺伝子やサイトカイン遺伝子の制御領域とウイルス・エンハンサーコア配列に結合することが明らかになった。さらに、DMSメチレーション阻害実験によりNF-IL 6  $\beta$ とNF-IL 6はIL-6プロモーター領域内の同じ配列を認識することが明らかになった。

3. NF-IL 6  $\beta$ とNF-IL 6によるヘテロダイマー形成の解析

NF-IL 6  $\beta$ とNF-IL 6のヘテロダイマー形成はNF-IL 6遺伝子5'上流域をDNAプローブとして用いたgel

shift assay により解析した。それぞれのリコンビナントプロテインを作製し 37°C15 分のプレインキュベーションの後 gel shift assay を行った。その結果、NF-IL 6  $\beta$  と NF-IL 6 を混合したものではそれぞれのホモダイマーのバンドの中間の位置に新しいバンドが出現し NF-IL 6  $\beta$  と NF-IL 6 のヘテロダイマーの形成が確認された。また、この時それぞれのホモダイマーは完全に消失していた。

#### 4. 転写活性における NF-IL 6 $\beta$ と NF-IL 6 の相乗効果の解析

NF-IL 6  $\beta$  と NF-IL 6 の cDNA 発現ベクターを作製し、IL-6 遺伝子 5' 上流域をルシフェラーゼ遺伝子に連結させたレポーター遺伝子とともに胎児性癌細胞株 P19 細胞にリン酸カルシウム法にてトランジェントに遺伝子導入し、ルシフェラーゼの発現を指標にそれぞれの遺伝子の転写活性を測定した。NF-IL 6  $\beta$  の転写活性は用量依存的に上昇したが、NF-IL 6 の転写活性は変化しなかった。更に、NF-IL 6  $\beta$  と NF-IL 6 のコトランスフェクション実験ではそれぞれを単独でトランスフェクトしたときよりも強い転写活性が認められた。

#### 5. NF-IL 6 $\beta$ の発現の解析

LPS 刺激、未刺激マウスの各種臓器より polyA<sup>+</sup> RNA を抽出し NF-IL 6  $\beta$  特異的プローブを用いてノーザンブロット解析を行った。NF-IL 6  $\beta$  は LPS 刺激を行ったマウスの臓器でのみにその発現が認められた。

(総括)

NF-IL 6 関連遺伝子である NF-IL 6  $\beta$  をクローニングしそのアミノ酸一次構造を明らかにした。NF-IL 6  $\beta$  は 269 アミノ酸残基よりなり、C 末側に DNA 結合領域とロイシンジッパー領域を有していた。そして NF-IL 6  $\beta$  と NF-IL 6 はこれらの領域において高いアミノ酸相同性を示すと同時に、同一の DNA 配列を認識することが明らかになった。NF-IL 6  $\beta$  は NF-IL 6 と選択的にヘテロダイマーを形成した。NF-IL 6  $\beta$  は NF-IL 6 よりも強い転写活性を示し、これらの転写因子間には転写における相乗効果が認められた。更に、NF-IL 6  $\beta$  の発現は NF-IL 6 と同様に各種外的刺激により誘導されることが明らかとなった。以上の結果より IL-6 遺伝子発現に NF-IL 6  $\beta$  が NF-IL 6 とともに重要であることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、Interleukin-6 (IL-6) 遺伝子の転写制御機構を分子レベルで解析した論文である。IL-6 は、生体防御反応において中心的役割を果す一方、その発現異常は骨髄腫、関節リウマチ、メサンギウム増殖性腎炎、AIDS におけるカポジ肉腫の病因、病態に関与することが知られている。そして、IL-6 遺伝子発現機構を解明することは、IL-6 発現異常により生じる疾患の発症、進展を分子レベルで解明する上で重要であるという立場から本研究がなされた。IL-6 遺伝子発現に関与する転写因子としてすでに NF-IL 6 遺伝子がクローニングされているが、本研究では IL-6 遺伝子発現機構をより詳細に理解するために関連遺伝子として NF-IL 6  $\beta$  を新たにクローニングし、その性質を明らかにした。更に、NF-IL 6  $\beta$  と NF-IL 6 がヘテロダイマーを形成すること、そしてそのヘテロダイマーは両者のホモダイマーより強い転写活性を示すことを明らかにした。このことは、IL-6 遺伝子発現を考えるうえで興味深い事実である。また本研究で得られた知見は転写因子における遺伝子発現の多様性をも説明するものであり、博士の学位を授与するに十分な研究内容であると認められる。