

Title	IL-6発現におけるHTLV-1 Taxと転写因子NF-IL6の相乗効果
Author(s)	松阪, 泰二
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3065794">https://doi.org/10.11501/3065794</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University



IL-6発現におけるHTLV-1 Taxと  
転写因子NF-IL6の相乗効果  
HTLV-1 Tax and NF-IL6 synergistically activate  
transcription of the IL-6 gene

大阪大学細胞生体工学センター免疫系形成研究分野  
Division of Immunology, Institute for Molecular and Cellular Biology,  
Osaka Univ.

松 阪 泰 二  
Matsusaka Taiji

Normal unstimulated T-cells do not produce IL-6, but T-cells infected with human T-cell leukemia virus-1 (HTLV-1) constitutively express IL-6. To understand the mechanism of this IL-6 gene dysregulation, I investigated the effects of Tax on the cellular transcription factors, NF-IL6 and NF- $\kappa$ B, both of which are important for the IL-6 gene induction. By transient cotransfection assays, it was demonstrated that NF-IL6 and NF- $\kappa$ B act synergistically to transactivate the IL-6 gene. NF- $\kappa$ B binding site, but not NF-IL6 binding site, was indispensable for this synergism. It was also elucidated that NF-IL6 and Tax synergistically transactivate the IL-6 gene. Mutations in NF- $\kappa$ B binding site remarkably diminished this synergism, suggesting that both NF-IL6 and NF- $\kappa$ B family member(s) are involved in Tax activation of the IL-6 gene.

Key Words : Human T-cell leukemia virus-1 (HTLV-1), Tax, IL-6, NF- $\kappa$ B, NF-IL6

## 緒 言

IL-6の恒常的発現は、慢性関節リウマチ、多発性骨髄腫、カポシ肉腫等様々な疾患の発症や病態形成に深く関わっている<sup>1)</sup>。このようなIL-6の発現異常を来たす疾患の一つに、Human T cell leukemia virus-1 (HTLV-1)感染症がある。HTLV-1は、Adult T cell leukemiaやHTLV-1 associated myelopathy (HAM) / tropical spastic paresis (TSP)の原因ウイルスであるが、正常T細胞は、ほとんどIL-6を分泌しないのに対して、HTLV-1で形質転換したT細胞は、IL-6を構成的に発現している<sup>2)</sup>。またT細胞以外でもHTLV-1をヒト単球やマクログリア細胞に感染させることができ、それによってIL-6の産生が増強することも報告されている<sup>3)</sup>。HTLV-1の感染によりIL-6の分泌が亢進する病的な意義は明らかでないが、HTLV-1感染者にみられる特異な関節炎、HTLV-1 associated arthropathy (HAA)の病態を形成したり、HAMにおける神経障害に関与している可能性がある。

HTLV-1は、他のレトロウイルスにはない特有の制御遺伝子を持ち、そのうちの一つtaxは、40Kdの蛋白(Tax)をコードする。Taxはウイルス自身のLTRの転写を活性化するとともに、IL-6、IL-2、IL-2R、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、PTH related peptide、c-fos等種々の細胞側の遺伝子の転写も活性化する<sup>4)</sup>。Tax自身にはDNA結合能は持たないため、細胞側の転写因子に作用することにより、これらの転写の活性化を起こすものと考えられている。

IL-6遺伝子の-73から-53のGGGATTTTCCにはNF- $\kappa$ Bが結合可能で、IL-6の発現に重要であることが報告されている<sup>5)</sup>。また-158から-145のACATTGCACAATCTは、IL-1によるIL-6発現誘導に重要で、ここに結合する転写因子として、NF-IL6がクローニングされた<sup>6)</sup>。IL-6遺伝子の発現には、この2つの転写因子が重要である。したがってTaxはこれらの2つのいずれかの因子に作用することによって、IL-6の転写を活性化するものと思われる。

そこでTaxによるIL-6発現誘導のメカニズム解明のため、TaxはNF- $\kappa$ BおよびNF-IL6の作用にいかなる影響を与えるか、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。

## 材料と方法

プラスミド：リポーター遺伝子として、ヒトIL-6遺伝子の-175から+12とルシフェラーゼの融合遺伝子を用いた。また、合成オリゴヌクレオチドを利用した人工変異導入法によって、NF- $\kappa$ B結合部位GGGATTTTCCをAATATTTTCCに、NF-IL6結合部位ACATTGCACAATCTをACACTACAAACTCTにそれぞれ変異させたりポーター遺伝子も作成した。エフェクター遺伝子として、いずれもCMVプロモーターでドライブされるNF- $\kappa$ B p50、NF- $\kappa$ B p65、NF-IL6、Taxの各発現ベクターを使用した。このうちTaxの発現ベクターpCG-Taxは東大医科研吉田光昭先生より、NF- $\kappa$ B p65の発現ベクターはロックフェラー大学藤田尚志博士より供与された。

細胞とルシフェラーゼアッセイ：Embryonic carcinoma 細胞株P19を、6cmプレート1枚あたり $1 \times 10^5$ 個まき、 $\alpha$ MEM+10%FCS、5%CO<sub>2</sub> 37°Cで培養した。24時間後リポーター遺伝子5 $\mu$ gと、種々の組み合わせのエフェクター遺伝子各0.5 $\mu$ gを、トランスフェクションのコントロールとして用いたBOS-lacZ 0.1 $\mu$ gとともに、リン酸カルシウム法でトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性をPica Geneキットを使用して測定した。

## 結 果

### 1.NF- $\kappa$ BとNF-IL6の間の相乗効果

まずはじめに、Taxが存在しないときのNF- $\kappa$ BとNF-IL6の相互作用を検討した(Figure 1A)。野生型レポーター遺伝子のみのルシフェラーゼ活性を1とすると、NF- $\kappa$ B p50単独では1.2、p65単独では1.9、p50とp65を1:1で混合したものでは1.6、NF-IL6単独では2.2のルシフェラーゼ活性を示した。NF- $\kappa$ B p50+NF-IL6では2.7と、両者の作用は相加的であったが、NF- $\kappa$ B p50-p65+NF-IL6あるいはNF- $\kappa$ B p65+NF-IL6では、9.6、26.5と高いルシフェラーゼ活性を示し、それぞれ3.4倍、8.5倍の相乗効果が認められた。

次にこれらの相乗効果が、リポーター遺伝子のNF-IL6結合部位あるいはNF- $\kappa$ B結合部位の変異により、どのような影響を受けるか検討し

た。NF-IL6結合部位を変異させても、p50-p65とNF-IL6、p65とNF-IL6の間の相乗作用は、3.2倍、3.9倍と、野生型の場合より低下するものの明らかに残存した(Figure 1B)。これに対して、NF-κB結合部位を変異させると、p50-p65とNF-IL6、p65とNF-IL6の間の相乗作用は全く消失した(Figure 1C)。

## 2. TaxとNF-IL6の間の相乗効果

次にTaxとNF-κBおよびNF-IL6の間の相互作用を検討した(Figure 2)。Tax単独でのルシフェラーゼ活性の増加は1.8倍に過ぎず、またTaxとNF-κB p50、p50-p65、p65とは、それぞれ相加的な増加しか示さなかったが、TaxとNF-IL6を同時にトランスフェクトしたときのみ、2.7倍の相乗的な増加が認められた。

またNF-κB+NF-IL6にTaxを加えたときの効果を検討した(Figure 3)。Taxはp50+NF-IL6を2.7から11.0へと増加させ、Taxとp50+NF-IL6との間の相乗効果は4.1倍であった。しかし p50-p65+NF-IL6あるいは p65+NF-IL6では、すでにそれだけで高いルシフェラーゼ活性を示し、そこにTaxを加えても1.2~1.3倍の増加しか示さなかった。

次にこれらのTaxとNF-IL6あるいはNF-IL6+p50との間の相乗効果が、リポーター遺伝子のNF-IL6結合部位あるいはNF-κB結合部位の変異によりどのような影響を受けるか検討した。NF-IL6結合部位を変異させても、野生型の場合より低下するものの、NF-IL6とTaxの間には1.6倍の、NF-IL6+p50とTaxの間には2.2倍の相乗効果がそれぞれ残存した(Figure 4A)。これに対して、NF-κB結合部位を変異させると、TaxとNF-IL6、あるいはTaxとNF-IL6+p50の間には、若干の相加以上の増加が認められたものの相乗作用は著しく低下した(Figure 4B)。

## 考 察

本研究では、第一にIL-6遺伝子の転写におけるNF-IL6とNF-κBの相乗効果を、第二にNF-IL6とTaxの相乗効果を示した。

IL-6遺伝子の-73から-53のGGGATTTTCCはIL-6の発現に重要で、IL-1、TNF-α、PMAで誘導されるNF-κB様の蛋白が結合することが示されている<sup>5)</sup>。またリコンビナントのNF-κB p50蛋白は、同部位に結

合可能である。p50ホモダイマーは、MHC class1遺伝子の結合部位 GGGATTCCCCに結合するときと、免疫グリンプリンκ鎖遺伝子の結合部位GGGACTTTCCに結合するときと、蛋白のコンフォーメーションが異なり、前者に対してのみ転写活性をもつという報告もある<sup>7)</sup>。IL-6遺伝子のNF-κB結合部位はκ鎖遺伝子のそれに極めて類似し、p50ホモダイマーはIL-6遺伝子の転写を活性化しないと予想される。p50はNF-IL6のあるなしにかかわらず弱い転写活性しか示さないという本実験の結果は、それに一致する。また配列から予想すれば、IL-6遺伝子のNF-κB結合部位は、p50-p65ヘテロダイマーもp65ホモダイマーもいずれも結合できると考えられる。p65ホモダイマーが実際に生体内で存在するかどうかは、今まで検出に用いられたDNAとp65ホモダイマーの親和性が低いこともあって明らかではないが、その存在を示唆するような報告もある<sup>8)</sup>。ところが、p50-p65ヘテロダイマーにしるp65ホモダイマーにしるそれだけでは、P19ではIL-6遺伝子の発現において弱い転写活性しか示さず、IL-6の強力な発現にはNF-IL6との相乗作用が必要であった。実際の炎症状態を考慮すれば、NF-κBが細胞質から核内に移行するとともに、NF-IL6の合成が増加し、核内のNF-IL6の量が増大する。この両者が相乗的に作用することによって、強力なIL-6遺伝子の発現が起こると考えられる。

NF-κB p50、p65はrelファミリーに属し、NF-IL6はbZip構造をもちC/EBPファミリーに属する。それぞれのファミリーのメンバーは、ファミリー内ではダイマーを形成しうるが、二つのファミリーは構造的に全く異なっている。NF-IL6とNF-κBの相乗効果は、NF-IL6結合部位を変異させても認められることから、両者の蛋白間に直接の結合があることが示唆される。実際p50のrelホモロジドメインとNF-IL6のロイシンジッパーモチーフは直接に結合しうることがすでに報告されている<sup>9)</sup>。p65とNF-IL6の相乗効果は、NF-IL6結合部位を変異させても認められることから、NF-IL6とp65の間にも直接の蛋白間の結合があることが予想される。

二つの転写因子の蛋白間の相互作用が、転写に影響を与える例がいくつかが報告されている。二ヶ所のSp-1結合部位があると、複数のSp-1

蛋白が高次のコンプレックスを形成し、一ヶ所のSp-1結合部位をもつ場合の数十倍の転写活性化を示すことが報告されている<sup>10)</sup>。また、GR(Glucocorticoid Receptor)とAP-1(c-Jun/c-Fos)は互いに転写を阻害しあうが、両者は直接結合することが示されている<sup>11)</sup>。同様にMyoDとc-Junは互いに拮抗しあうが、この両者の間に直接の結合があることが示されている<sup>12)</sup>。また急性期蛋白 $\alpha$ 1 acid glycoproteinの発現において、NF-IL6とGRは相乗的に転写活性化し、両者の蛋白間に直接の結合があることが示されている。この場合、NF-IL6の結合部位、あるいはGRの結合部位のどちらか一方を破壊した場合も、相乗効果は残存する<sup>13)</sup>。IL-6遺伝子の場合、なぜNF-IL6結合を変異させてもNF-IL6とNF- $\kappa$ Bの相乗効果は残存するのに、NF- $\kappa$ B結合部位を変異させると相乗効果が全く消失してしまうのかは、今後に残された問題である。

NF-IL6とNF- $\kappa$ Bの両者が発現に関与している遺伝子として、IL-6のほかに、IL-8、G-CSF、TNF- $\alpha$ 、SAA(serum amyloid A protein)などがある。IL-8の場合、NF-IL6結合部位とNF- $\kappa$ B結合部位は隣接して存在し、両者は相乗的に転写を活性化する。他の炎症性サイトカインや急性期蛋白の発現においても、NF-IL6とNF- $\kappa$ Bの相乗作用は、重要な役割をしている可能性がある。

現在、Taxがウイルス自身のLTRや細胞側の遺伝子の転写を活性化するメカニズムは完全には解明されていないが、Tax自身には、配列特異的なDNA結合能が認められないので、細胞側の転写因子に作用に作用することによっている考えられている。HTLV-1 LTRの転写活性化には、主にTRE-1(Tax responsive element-1)と呼ばれる21bpの配列が重要で、ここにはCREB(cAMP responsive element binding protein) / ATF(activating transcription factors)ファミリーが結合しうる。Taxは、CREBホモダイマーおよびCREB/ATF-1ヘテロダイマーと結合しうることが報告されている<sup>14)</sup>。またTaxによるc-fosの転写活性化には、CArG boxとよばれる配列が重要で、Taxはそこに結合する転写因子SRF(serum response factor)と結合しうることが報告されている。IL-2R、HIV LTR、TNF- $\alpha$ のTaxによる転写活性化にはNF- $\kappa$ B結合部位が重要である。Jurkat細胞では、Taxのトランスフェクションにより、ゲルシ

フトアッセイで核内にNF- $\kappa$ Bファミリーの誘導が観察される<sup>1,2)</sup>。したがってTaxは、NF- $\kappa$ Bファミリーの合成を増加させたり、細胞質から核への移行を促進したりして、量的に核内のNF- $\kappa$ Bファミリーを増大させるか、NF- $\kappa$ BファミリーのDNAの結合能を増強させるという質的な変化のいずれかの機序により、NF- $\kappa$ B依存性に転写を活性化するものと思われる。

本実験において、レポーター遺伝子のNF- $\kappa$ B結合部位を変異させることにより、著しくルシフェラーゼ活性が低下したことから、TaxによるIL-6転写活性化には、NF- $\kappa$ Bファミリーの量的な増加を介している可能性がある。もしそうだとすれば、TaxはNF- $\kappa$ Bを誘導し、NF- $\kappa$ BがNF-IL6と相乗的に働くことにより、TaxとNF-IL6の相乗効果が生ずると説明できる。またNF- $\kappa$ BとTaxは相乗的に作用しなかったので、TaxがNF- $\kappa$ BのDNAの結合能を増強させるという質的な変化によってIL-6の転写を活性化するという可能性は考えられない。またNF- $\kappa$ B結合部位を変異させても、TaxによるNF-IL6の増強が完全には消失しなかったので、Taxは、NF- $\kappa$ Bと関係なしに、NF-IL6と直接結合しその作用を増強することによって、IL-6の転写を活性化する可能性も考えられる。しかしながら、そのモデルが真実であるとしても、NF- $\kappa$ B結合部位の変異により、ルシフェラーゼ活性は著しく低下したので、NF- $\kappa$ BファミリーがIL-6遺伝子の転写活性化に重要な役割をしていることは否定できない。いずれのモデルを考えるにせよ、本実験の結果より、TaxによるIL-6遺伝子の転写活性化には、NF-IL6とNF- $\kappa$ Bファミリーの双方が必要であると推察される。

## 結 語

P19細胞を用いた、ルシフェラーゼアッセイにより、IL-6遺伝子の発現における2種の転写因子NF-IL6、NF- $\kappa$ BとTaxの相互作用を検討した。

1. IL-6の遺伝子発現において、NF-IL6とNF- $\kappa$ Bは相乗的に作用し、この相乗作用にはP65サブユニットが関与した。
2. この相乗作用には、NF- $\kappa$ B結合部位は必須であったが、NF-IL6結



合部位は必ずしも必要でなかった。

3. IL-6の遺伝子発現において、TaxはNF-IL6と相乗的に作用したが、NF- $\kappa$ B P50, P65 とは相乗作用を示さなかった。しかしながら、TaxとNF-IL6の相乗作用は、NF- $\kappa$ B結合部位を変異させると、著しく低下した。

したがって、TaxによるIL-6の転写活性化には、NF-IL6とNF- $\kappa$ Bファミリーの双方が必要であると推察される。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導後校閲を賜りました岸本忠三教授に深甚なる謝意を表するとともに、絶えず御指導、御協力をいただきました大阪大学細胞生体工学センターの審良静男先生に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

1) Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its receptor: A paradigm for cytokines. *Science* 258 : 593-597, 1992.

2) Simizu K, Hirano T, Ishibashi K, Nakano N, Taga T, Sugamura K, Yamamura Y, Kishimoto T. Immortalization of BGDf (BCGF II)- and Bcdf-producing T cells by human T cell leukemia virus (HTLV) and characterization of human BGDf (BCGF II). *J Immunol* 134 : 1728-1733, 1985.

3) Hoffman PM, Dhib-Jalbut S, Mikovits JA, Robbins DS, Wolf AL, Bergey GK, Lohrey NC, Weislow OS, Ruscetti FW. Human T-cell leukemia virus type 1 infection of monocytes and microglial cells in primary human cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 11784-11788, 1992.

4) Sodroski J. The human T-cell leukemia virus (HTLV) transactivator (Tax) protein. *Biochim Biophys Acta* 1114 : 19-29, 1992.

5) Simizu H, Mitomo K, Watanabe T, Okamoto S, Yamamoto K. Involvement of NF- $\kappa$ B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol Cell Biol* 10 : 561-568,

1990.

6 ) Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* 9 : 1897-1906, 1990.

7 ) Fujita T, Nolan GP, Ghosh S, Baltimore D. Independent models of transcriptional activation by the p50 and p65 subunit of NF- $\kappa$ B. *Genes Dev* 6 : 775-787, 1992.

8 ) Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA. Selection of optimal  $\kappa$ B/Rel DNA-binding motifs: Interaction of both subunits of NF- $\kappa$ B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12 : 4412-4421, 1992.

9 ) LeClair KP, Blonar MA, Sharp PA. The p50 subunit of NF- $\kappa$ B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 8145-8149, 1992.

10 ) Pascal E, Tjian R. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev* 5 : 1646-1656, 1991.

11 ) Yang-Yen H, Chambard JC, Sun Y, Smeal T, Schmidt TJ, Droulin J, Karin M. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: Mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62 : 1205-1215, 1990.

12 ) Bengal E, Ransone L, Scharfmann R, Dwarki VJ, Tapscott SJ, Weintraub H, Verma IM. Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: A direct physical association. *Cell* 68 : 507-519, 1992.

13 ) Nishio Y, Isshiki H, Kishimoto T, Akira S. Nuclear factor-interleukin 6 and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat  $\alpha$ 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction. *Mol Cell Biol* 13 in press, 1993.

14 ) Zhao L, Giam C. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-1 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 7070-7074, 1992.

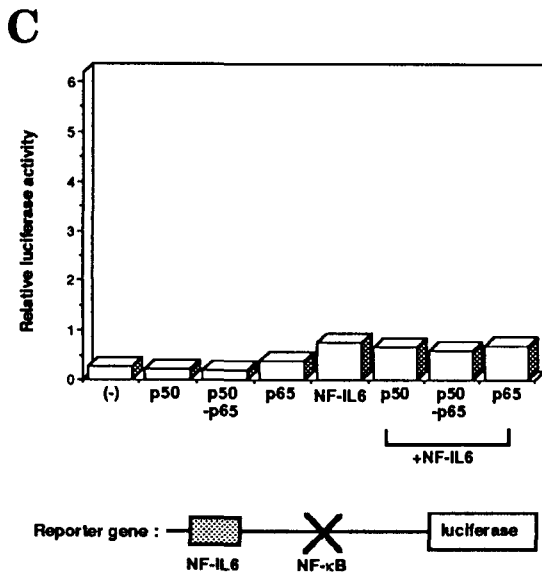
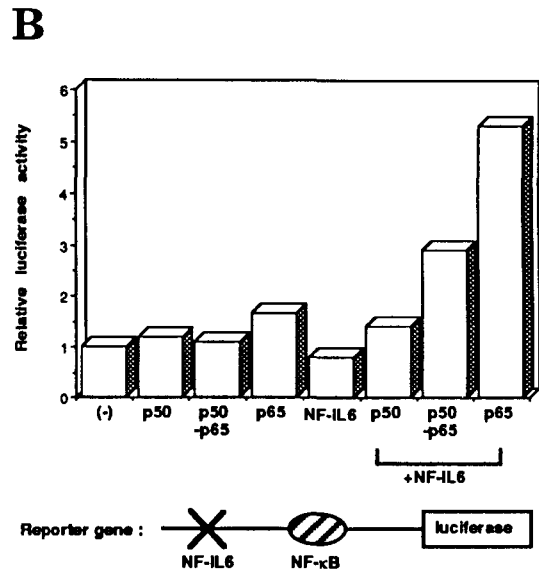
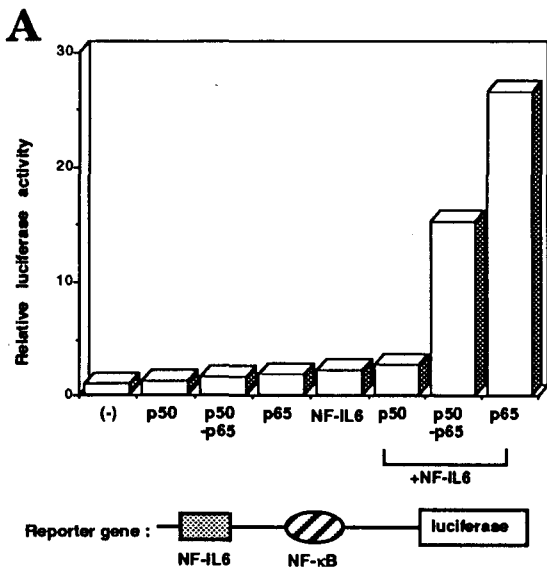
15 ) Fujii M, Tsuchiya H, Chuhjo T, Akizawa T, Seiki M. Interaction of HTLV-1 Tax1 with p67<sup>SRF</sup> causes the aberrant induction of cellular immediate early genes through CA<sub>T</sub>G boxes. *Gene Dev* 6 : 2066-2076, 1992.

16 ) Leung K, Nabel G. HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF- $\kappa$ B-like factor. *Nature* 333 : 776-778, 1988.

## 抄 録

HTLV-1のコードするウイルスの転写制御因子Taxは、IL-6を含む種々の細胞側の遺伝子に転写も活性化する。そのメカニズム解明のため、IL-6の発現に重要な転写因子NF- $\kappa$ BおよびNF-IL6の作用に、Taxがいかなる影響を与えるか、ルシフェラーゼアッセイにより検討した。

IL-6遺伝子の発現において、NF-IL6とNF- $\kappa$ B p50-p65あるいはNF-IL6とp65は相乗的に作用した。この相乗効果はNF-IL6結合部位を変異させても残存したが、NF- $\kappa$ B結合部位の変異により消失した。またNF-IL6とTaxも相乗的に作用したが、この相乗作用はNF- $\kappa$ B結合部位の変異により著しく減弱した。したがって、TaxによるIL-6の転写活性化には、NF-IL6とNF- $\kappa$ Bファミリーの双方が必要であると推察される。



**Figure 1.** Synergistic activation of the IL-6 gene by NF-IL6 and NF-κB, and the effects of the disruption of the NF-IL6 or NF-κB binding site. Five micrograms of the reporter plasmid, (A) : the wild type IL-6 (-179-+12) luciferase gene, (B) : the IL-6 luciferase gene with the disrupted NF-IL6 site, (C) : the IL-6 luciferase gene with the disrupted NF-κB site, was transfected into P19 cells together with the indicated effector plasmid (0.5 μg each). The amount of transfected DNA was adjusted to 15μg with control DNA. Luciferase activity was assayed 48 hours after transfection and the results are presented as fold induction relative to the activity measured in cells transfected with the wild type reporter gene.

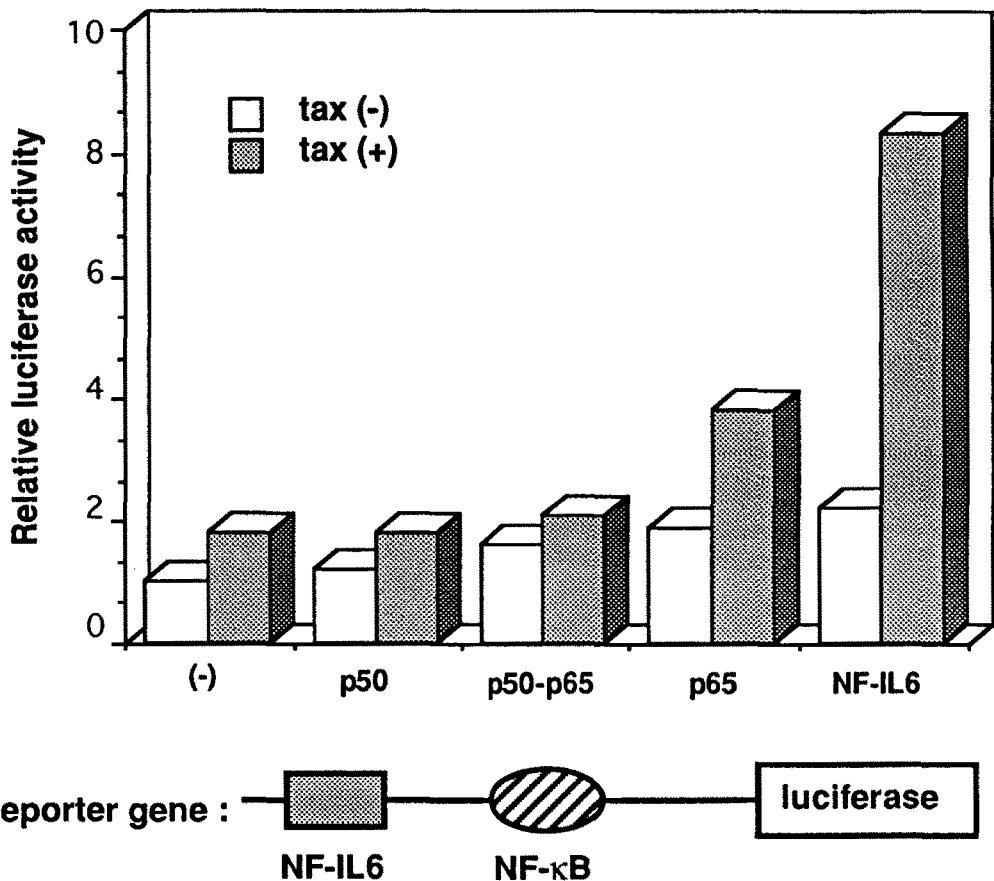


Figure 2. Synergistic activation of the IL-6 gene by NF-IL6 and Tax. Five micrograms of the wild type IL-6 luciferase gene was transfected into P19 cells with the indicated effector plasmid (0.5  $\mu$ g each) and with (closed column) or without (hatched column) 0.5  $\mu$ g of tax expression vector. Other conditions are the same as those described in the legend to Figure 1.

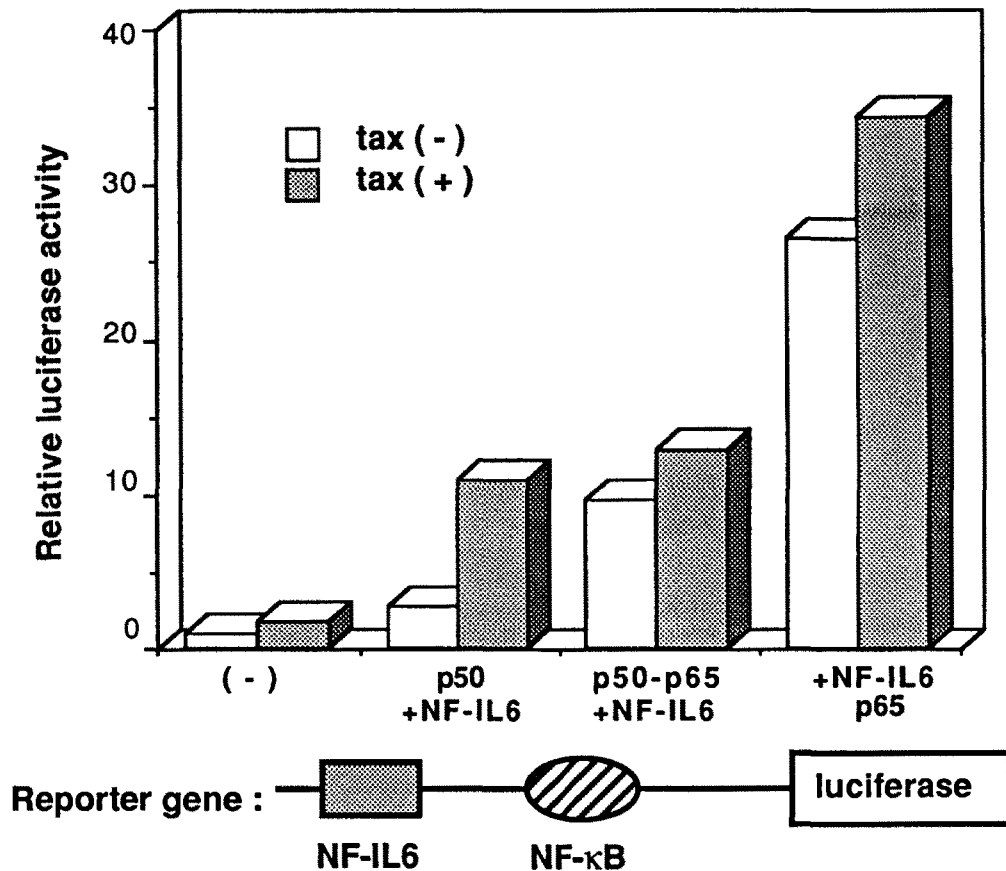
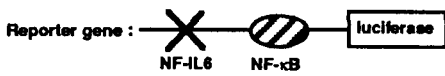
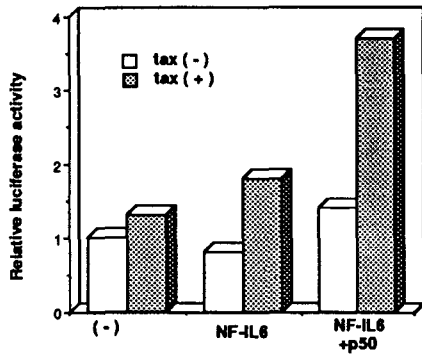
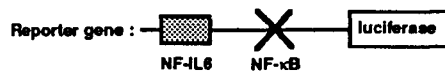
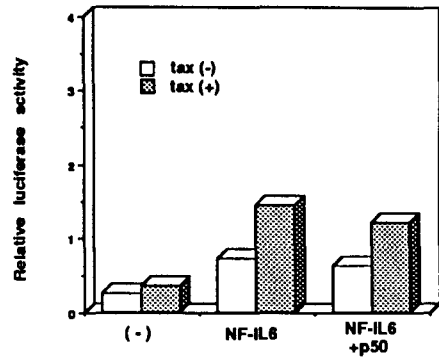


Figure 3. Tax synergistically activates the effect of NF-IL6 plus p50 on the IL-6 gene regulation. Five micrograms of the wild type IL-6 luciferase gene was transfected into P19 cells with the indicated effector plasmids (0.5  $\mu$ g each) and with (closed column) or without (hatched column) 0.5  $\mu$ g of tax expression vector. Other conditions are the same as those described in the legend to Figure 1.

**A****B**

**Figure 4.** The effects of the disruption of the NF-IL6 or NF-κB binding site on the synergism between NF-IL6 and tax. (A) the IL-6 luciferase gene with the disrupted NF-IL6 site or (B) the IL-6 luciferase gene with the disrupted NF-κB site (0.5 μg each) was transfected into P19 cells together with the indicated effector plasmid (0.5 μg each) and with (closed column) or without (hatched column) 0.5 μg of tax expression vector. Other conditions are the same as those described in the legend to Figure 1.