



Title	NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type16 through binding to the noncoding region
Author(s)	京, 哲
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38623
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	きょう 京	さとる 哲
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	
学位記番号	第 10916 号	
学位授与年月日	平成 5 年 9 月 17 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当	
学位論文名	NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region (NF-IL6による HPV16初期遺伝子発現の抑制)	
論文審査委員	(主査) 教授 谷澤 修 (副査) 教授 羽倉 明 教授 平野 俊夫	

論文内容の要旨

【目的】

Human papillomavirus (HPV) は子宮頸癌組織より高率に分離される DNA ウィルスで、その遺伝子には種々の細胞に対する形質転換能や不死化能が存在することから子宮頸癌の発生、進展に関わる病原ウィルスとして注目されている。HPV の癌遺伝子として知られている E6/E7 遺伝子の転写調節は、その上流域にある転写調節域 (Non Coding Region: NCR) で行なわれる。ここにはある種の細胞性核内蛋白が結合し下流の初期遺伝子の転写を調節する。これらの核内蛋白はいずれも転写の活性化因子であり、抑制的に働くものはこれまで見い出されていなかった。近年、炎症刺激で誘導され、IL-6などのサイトカインや種々の炎症関連物質の遺伝子上流の特異的なパリンドローム配列に結合し、その遺伝子の発現を調節する核内蛋白 nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) がクローニングされた。NF-IL6は SV40 や polyomavirus などのウイルスエンハンサーにも結合することが報告され、ウイルス遺伝子に対する機能や意義が注目されているが、HPV16NCR 内にも NF-IL6 の binding motif 類似の塩基配列がいくつか存在している。本研究では、NF-IL6 の HPV 初期遺伝子発現への関与について検討した。

【方法ならびに成績】

- 1) NF-IL6 の fusion protein を作製し、NF-IL6 と HPV16 型の NCR との結合を gel retardation assay および DNA foot printing analysis にて検討した。その結果 NF-IL6 は NCR と特異的に結合し、その結合部位は複数個存在することが明かになった。またこれらの結合部位は従来より知られていた HPV の転写活性因子 NF-1 や AP-1 の結合部位と一部重複していた。
- 2) NF-IL6 の HPV16NCR の転写活性に及ぼす影響を検討した。すなわち NF-IL6 の発現ベクターを HPV16NCR の下流に CAT gene をつないだ reporter gene とともに各種細胞に co-transfect し、CAT assay を行ったところ、NF-IL6 は HPV16 初期遺伝子の発現を抑制することが明かとなった。またその際、NCR の responsive element は NCR 中央の約 300bp に見いだされたが、この部位は先に見いだされた NF-IL6 の結合部位を多数有していた。

- 3) NF-IL6の転写抑制機能を確認するために、HPV16DNAが宿主DNAにintegrateされている子宮頸癌細胞株CaSki cellにNF-IL6の発現ベクターを導入し、NF-IL6が恒常に発現している4クローンについてE6/E7mRNAレベルをNorthern Analysisで解析した。その結果、各クローン間でNF-IL6mRNAの発現量とE6/E7mRNAの発現量の間には逆相関がみられ、NF-IL6がHPV16初期遺伝子の発現を抑制していることが示唆された。
- 4) NF-IL6の転写抑制機序を明かにするため、NF-IL6のDNA binding domainまたはfunctional domainを各々失活させたmutantを用いてCAT assayを行った。その結果、転写抑制にはDNA binding domainが必須であるがfunctional domainは必ずしも必要ではないことが明かになった。さらにHPVの転写活性因子NF-1およびAP1のNCR内の結合部位に相当するoligonucleotideを、NF-IL6とNCRのbinding assayのcompetitorとして用いたところ、bindingは完全に阻害された。以上よりNF-IL6がNF-1やAP1などの転写活性化因子とその結合部位を競合することが転写抑制の本態である可能性が示唆された。

【総括】

HPV遺伝子の転写を抑制する核内蛋白は今まで見い出されていなかったが、本研究にてNF-IL6がHPV16NCRと特異的に結合し、その転写活性を抑制することが初めて明らかにされた。この作用はその結合部位を競合することによる転写活性化因子の機能阻害によると推定された。一方炎症性サイトカインであるIL-1やTNFなどは、HPV初期遺伝子の発現を有意に抑制することが我々の実験で明らかになっている。またこの際NF-IL6mRNAが著明に誘導されることもわかっている。これらのことから、IL-1やTNFなどの炎症性サイトカインによるウイルス遺伝子発現調節機構のなかで、NF-IL6がサイトカインシグナルのfinal mediatorとしてHPV NCRに直接作用し、転写を制御している可能性が考えられる。このようなNF-IL6の機能は、ウイルス感染に対する宿主防御機構において重要な役割を演ずるものと推定される。

論文審査の結果の要旨

Human papillomavirus(HPV)は子宮頸癌の病原因子と考えられているDNAウイルスであるが、その癌遺伝子であるE6、E7遺伝子の発現制御については十分に解明されていない。本研究はウイルス感染などの炎症刺激で誘導される核内蛋白NF-IL6(nuclear factor for IL-6 expression)がHPV16型の遺伝子調節域noncoding region(NCR)に特異的に結合し、E6、E7遺伝子の転写発現を抑制することを示したもので、HPV癌遺伝子の発現を抑制する蛋白の存在を初めて明らかにしたものである。またその抑制機序として転写活性因子NF-1やAP1との結合部位の競合阻害による可能性を示している。これらの知見は、ヒトにおけるHPV癌遺伝子の発現制御のメカニズムを解明するうえで極めて重要であり、また将来的にHPV関連病変の治療に道を開く可能性がある。

以上より本研究は学位の授与に充分値するものと考える。