

Title	Coordinated Interactions of Transcription Factors Involved in the Gene Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1
Author(s)	山本, 一男
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38864
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	山本 一 男
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 11229 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	Coordinated Interactions of Transcription Factors Involved in the Gene Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1 遺伝子発現に関与する転写因子の協調的相互作用)
論文審査委員	(主査) 教授 京極 好正 (副査) 教授 小川 英行 教授 浅野 朗

論文内容の要旨

ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus Type 1; HIV-1) は、Tリンパ球に感染し、数年に及ぶ潜伏期間を経た後、爆発的に増殖して免疫系を破壊する。この特徴的なウイルス生活環は、ウイルス自体がコードしている調節蛋白質や細胞側の因子によって制御されている。そこで、転写段階におけるウイルス活性化の分子機構に焦点を絞り、HeLa細胞S3株より得た核蛋白質の抽出液をRNA polymerase II等の基本転写因子の供給源とし、HIV-1 Long Terminal Repeat (LTR) からの run-off 転写産物を解析する *in vitro* 転写系を調製した。これに、HIV-1 感染細胞の核蛋白質抽出液、またはその粗精製標品を添加したときに起こる転写産物量の増加を指標として、HIV-1 LTR に特異的に作用する転写活性化因子を検索する実験系を確立した。HIV-1 を感染させたヒト T 細胞培養株 H9 の核蛋白質抽出液を Heparin-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより分画し上記転写系に加えたところ、0.4M KCl 溶出画分に最も高い HIV-1 LTR 特異的な転写活性化が見られた。さらにこの分画を DEAE-Sepharose カラムにかけ、0.1M, 0.2M, 0.4M KCl で溶出した分画 (それぞれ Fr4.1, Fr4.2, Fr4.4 とする) を解析したところ、Fr4.2 に最も高く、また Fr4.4 にも若干の転写活性化が見られた。Fr4.1 単独では見かけ上活性を持たないが、Fr4.2 あるいは Fr4.4 と組み合わせると転写量を増大させることが解った。このことから、Fr4.1 には転写促進因子が存在し、他の分画に含まれている HIV-1 LTR 特異的な活性化因子と協同的に作用することによって強い転写活性を示すことが考えられる。

これらの活性が、HIV-1 LTR 上の cis-element を認識する DNA 結合蛋白質に対応するかどうかを調べるために、各分画を用いて DNase I フットプリント実験を行った。転写開始点近傍の領域について調べた結果、Fr4.1 にはエンハンサー配列に、Fr4.2 には Trans-activation responsive (TAR) 領域に結合する因子が含まれていることが解った (図1)。両分画はまた、Negative Regulatory Element (NRE) 内に隣接して結合する因子をそれぞれ含んでいた。

Fr4.1, Fr4.2 の各々で新しく検出された2種類の NRE 結合因子の機能を調べる目的で、TATA box 以外の全ての cis-element を欠失した Rous sarcoma virus のプロモーターの制御下に Chloramphenicol Acetyl Transferase 遺伝子 (CAT) を置いたプラスミドと、その上流に各因子の結合配列を4個直列につないだ DNA 断片を挿入したものを準備した。これらを Jurkat 細胞にトランスフェクションし、48時間後の CAT 活性を調べた。その結果、結合配列の挿入によってプロモーター強度が低下するとが観察された。これは、各因子が転写抑制因子として作用することを

示している。そこでこれらの因子を NRT-1, NRT-2 (Negative Regulator of Transcription) とした。

エンハンサー領域のフットプリント・パターンを詳細に調べたところ、Fr4.1のみならず Fr4.2 も、この領域に結合する因子を含んでいることが判明した。これらは、カラムクロマトグラフィー上で異なる塩濃度で溶出されること、エンハンサー領域への結合様式が異なることから、同じ領域に作用するが異なる分子であると推察される。この点を明らかにするため、エンハンサー領域をプローブにして UV-cross linking 実験を行った。その結果、Fr4.2 には Fr4.1 で検出されるものとは明らかに分子量の異なる複数のエンハンサー結合蛋白質が存在していることが示された。

さらに、エンハンサー領域と TAR 領域を有する DNA プローブを用いてフットプリント法による解析を進めた。Fr4.1 と Fr4.2 が共存する条件では、Fr4.1 単独の場合に比べるとより顕著なプロテクション・パターンがエンハンサー領域に観察された。これに対して TAR 領域を欠失したプローブでは、エンハンサー領域に対するプロテクションは、Fr4.1 単独の場合と Fr4.1 と Fr4.2 が共存する場合との間で差が見られなかった。これは、エンハンサー領域を認識する蛋白質の DNA への結合が、TAR に結合している因子によって強められることを示している。この結果は、Fr4.2 と Fr4.1 による相乗的転写活性化を説明するものと考えられる。

分子レベルでの詳細な解析を可能にするために、これらの因子をコードする cDNA の単離を試みた。ヒト T 細胞から調製した cDNA 発現ライブラリーを、各因子の結合部位 DNA プローブに対する特異的 DNA 結合能を指標にしてスクリーニングした (サウスウエスタン法)。約 10^5 個の組換えフェージから、TAR 領域 DNA に特異的に結合するクローンを得た。このフェージクローンの有する 2.1kb の cDNA 部分を大腸菌の発現ベクターに挿入して調製した融合蛋白質が、TAR 領域 DNA に対して塩基配列特異的に結合することを確認した。単離された cDNA を解析したところ、hnRNP 蛋白質 M4 の cDNA と同一であることが判明した。しかしながら、この蛋白質の TAR-DNA 結合性が示されたのは今回が初めてのことである。またこの蛋白質は、メチオニンとアルギニンに富む非常にユニークな繰り返し配列を持っているが、その特異構造と機能との関連については現在のところ不明である。

このように HIV-1 の遺伝子転写は、さまざまな転写因子とそれらの協調的相互作用によって抑制されていることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

山本一男君は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染細胞抽出液中に HIV-1 遺伝子の LTR に働いて、転写活性を活性化または抑制する蛋白質性因子の存在することを見出した。その中には LTR 中の NRE 領域、エンハンサー領域、TAR 領域に結合する成分が含まれており、それらが単独で働くよりも、協調的に働いて効果を強めることが判明した。さらに TAR 領域結合因子の cDNA を単離し、その塩基配列を解析した結果、既知の RNA 結合蛋白質 hnRNP M4 の cDNA と同一であることがわかった。以上のことは HIV-1 の発現には細胞側の蛋白質性因子が重要な働きをしていることが示されたわけで、今後 HIV-1 の感染後の対策を考える上で重要な知見を与えることになり、博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。