



|              |                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat $\alpha$ 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction |
| Author(s)    | 西尾, 幸浩                                                                                                                                                                                                            |
| Citation     | 大阪大学, 1994, 博士論文                                                                                                                                                                                                  |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/38914">https://hdl.handle.net/11094/38914</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>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           | にし お ゆき ひろ<br>西 尾 幸 浩                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 1 3 1 2 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<br>医学研究科外科系専攻                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 学 位 論 文 名     | <b>A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat <math>\alpha</math>1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction</b> (インターロイキン 6 発現に関わる核内因子 (NF-IL6) とグルココルチコイドレセプターは直接の蛋白-蛋白相互作用を介してラット $\alpha$ 1-酸性糖蛋白遺伝子の転写を相乗的に活性化する。) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 谷 澤 修<br>(副査)<br>教 授 岸 本 忠 三 教 授 平 野 俊 夫                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

急性期反応は、急性期蛋白と呼ばれ種々の血清蛋白の増加を伴う。これらの蛋白の生合成は、IL-1, IL-6, TNF  $\alpha$  といったいわゆる炎症性サイトカインとグルココルチコイドによって相乗的に制御をされている。近年 IL-6 の転写制御核内因子として遺伝子クローニングされた NF-IL6 は、IL-6 のみならず種々の急性期蛋白の発現にも関わっていることが明らかとなってきた。そこで炎症性サイトカインとグルココルチコイドによる相乗作用を分子レベルで解析するため、急性期蛋白の一種であるラット  $\alpha$ 1-酸性糖蛋白 (AGP) 遺伝子の系を用い、NF-IL6 と glucocorticoid receptor (GR) との間の相互作用について検討した。

#### 【方法および結果】

##### (1)AGP 遺伝子のプロモーター領域には NF-IL6 結合部位が 2 ケ所存在する。

AGP 遺伝子プロモーターには、- 120 ~ - 107 の部位に glucocorticoid responsive element (GRE) が存在することが知られている。ゲルシフト法およびフットプリント法により NF-IL6 は - 118 ~ - 95 の部位 (B1) ならびに - 87 ~ - 68 の部位 (B2) に特異的に結合することが示された。

##### (2)NF-IL6 は AGP 遺伝子の正の転写制御因子であり、GR と相乗的に作用する。

F9 細胞を用いた chrolamphenicol acetyl transferase (CAT) アッセイで AGP プロモーター - CAT 遺伝子は、NF-IL6, GR の各発現ベクターをリン酸カルシウム法で導入すると、1mM dexamethasone 存在下で各々 3.5% の CAT 活性を示した。両者を同時に発現させると 19.6% と相乗的な転写活性化が観察された。この際、NF-IL6, GR の発現量に変化のないことを免疫沈降法で確認した。

##### (3)AGP 遺伝子プロモーターに存在する 2 つの NF-IL6 結合部位は各々異なった機能を有する。

(1)で明らかとなった 2 つの NF-IL6 結合部位に変異を導入し GR による転写活性化に及ぼす影響を調べた。その結果、B1 は負の、B2 は正の活性を示した。B1, B2 の両方に変異を導入すると全体の転写活性は抑制されたが、興味あることに NF-IL6 と GR の相乗作用は依然として保たれた。GR 結合部位に変異を導入しても同様の結果を得た。

##### (4)DNA 結合活性のない NF-IL6 変異体、転写活性化部位を欠失した NF-IL6 変異体も GR による転写活性化を増強する。

(3)の結果から NF-IL6 と GR の両分子間には何らかの相互作用があると推定されたため、種々の NF-IL6 変異体を

用いて転写活性に及ぼす影響を検討した。これらの変異体は AGP 遺伝子を最大活性化する能力は欠いているものの、GR との相乗作用はなお有していた。

(5)GR の DNA 結合部位は NF-IL6 との相乗作用に必須である。

(4)と同様の実験を GR について行った。GR の DNA 結合部位以外を欠落させた変異体では相乗効果が保たれたが、DNA 結合部位に変異を加えると、相乗作用は失われた。

(6)NF-IL6 はその basic leucine zipper (bZip) 構造を介して、GR と in vitro において直接会合する。

以上の実験結果から NF-IL6 と GR の間には蛋白 - 蛋白相互作用が存在すると考えられた。そこで大腸菌で発現した maltose binding protein (MBP) と NF-IL6 の融合蛋白と、ウサギ網状赤血球ライセートで合成した 35 S 標識 GR をクロスリンクし、アフィニティ沈降法、免疫沈降法、蛋白 - 蛋白ブロッティング法を用いて検討したところ、両者の間には in vitro での会合が観察された。なおこの会合は NF-IL6 の bZip 構造に変異を加えたところ観察されなくなった。

#### 【考察】

本研究において、(1)NF-IL6 と GR は相乗的に作用する。(2)この相乗作用は NF-IL6, GR いずれか一方の因子の転写活性化部位、NF-IL6 の DNA 結合部位を欠いても観察される。(3)NF-IL6 はおそらくその bZip 領域を介して in vitro で GR と会合する。との新たな知見を得た。NF-IL6 は AGP 遺伝子においても他の急性期蛋白に対してと同様正の転写因子であることが示されたが、この作用は AGP 遺伝子プロモーターで同定した 2 つの NF-IL6 結合部位のうち下流側に存在する配列が関与しているものと考えられた。AGP 遺伝子プロモーターや、両転写因子の変異体を用い、転写活性への影響を検討した一連の実験結果から、NF-IL6 と GR との間には直接の会合が存在すると考えられ、事実 in vitro でその現象が証明された。この蛋白 - 蛋白相互作用は NF-IL6 と GR の相乗作用において、何らかの関与をしていることが示唆される。この会合が NF-IL6 の bZip 構造を介するという結果は、異なる転写因子群との相互作用にも、転写因子の DNA 結合ならびに 2 量体形成に関わる bZip 構造が関与することを示唆し興味深い。

最近、NF-IL6 と同様に急性期蛋白発現に関わる転写因子 NF- $\kappa$ B と NF-IL6 との間の蛋白 - 蛋白相互作用の存在が報告されたが、このような急性期反応をつかさどる一連の転写因子群が相互作用することは、外界からの侵襲に応じて異なった経路を介して伝達される信号に対し、生体が強調して効率的な反応を引き起こすのに役立っていると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は急性期反応における炎症性サイトカインとグルココルチコイドの間に観察される相乗的な急性期蛋白生合成の増強の機構を分子生物学的手法を用い明らかにしたものである。本研究から、生体防御において中心的役割を果たしている急性期反応の機序に核内転写因子である NF-IL6 とグルココルチコイドレセプターとの間の蛋白 - 蛋白相互作用が関与しているという新たな知見が得られた。この知見は、単に複数の転写因子間の相互作用を示しただけにとどまらず、急性期反応の分子レベルの本質的理解に迫るものであり、最終的に急性期反応の人為的制御に寄与することが期待される。よって、本研究は学位論文に値するものと認められる。