

Title	転写制御因子 Interferon Regulatory Factor (IRF)-1 の機能ドメインの解析
Author(s)	川上, 貴敏
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38915">https://hdl.handle.net/11094/38915</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	川上貴敏
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11261 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 医学研究科生理系専攻
学位論文名	転写制御因子 Interferon Regulatory Factor (IRF)-1 の機能 ドメインの解析
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 維紹 (副査) 教授 近藤 寿人 教授 辻本 賀英

### 論文内容の要旨

#### [目的]

Interferon Regulatory Factor (IRF)-1 は、I 型 IFN ( $\alpha, \beta$ ) 及び IFN 誘導遺伝子の転写活性化因子として機能する。さらに IRF-1 の作用は、構造類似性を有する転写抑制因子 IRF-2 によって抑制される。IRF-1 と IRF-2 の認識する DNA 配列は同じであることから、両者は DNA 結合部位上で互いに競合し遺伝子の発現を制御していると考えられる。一方 IRF-1 遺伝子は IFN により発現誘導されることから、IFN の生理作用を調節していると考えられた。実際 IRF-1 を細胞内に高発現させることにより、抗ウイルス作用が誘導された。さらには IRF-1 は癌抑制遺伝子として機能することが示された。

本研究では IRF-1 による遺伝子の発現及び IFN の生理作用の誘導の分子メカニズムを明らかにする目的で IRF-1 の様々な欠失変異体を作製し、IRF-1 の機能ドメインの同定及び機能解析を行った。

#### [方法]

##### 1) IRF-1 の欠失変異体の作製

IRF-1 はその N 末端側の DNA 結合領域の他、アミノ酸の一次構造の特徴により塩基性アミノ酸に富む領域、セリン-スレオニンに富む領域、酸性アミノ酸に富む領域に分けられる。そこでこれらの領域を欠失する一連の欠失変異体を作製した。

##### 2) IRF-1 及びその変異体の転写活性化能

IRF-1 及び変異体の転写活性化能は、IRF-1 の DNA 結合配列を有する CAT 遺伝子をレポーター遺伝子として CAT アッセイにより検討した。細胞はマウス L929 細胞あるいは IRF-1, IRF-2 共に発現していない P19 細胞を用いた。

##### 3) IRF-1 の細胞増殖に対する作用

IRF-1 の細胞増殖に対する作用を調べるため、IRF-1 とヒト estrogen receptor のホルモン結合ドメイン (ER) の融合遺伝子を構築した (pIRF-1ER)。pIRF-1ER と neomycin 耐性遺伝子を共に L929 細胞に遺伝子導入後、G418 で選択し stable transfectant を樹立した。この細胞では  $\beta$ -estradiol 存在下、IRF-1 の作用が誘導特異的に見られる。IRF-1 による細胞増殖に対する作用は、 $[^3\text{H}]$ -thymidine の取り込み及び細胞数によって評価した。

##### 4) IRF-1 の各種プロモーター活性に対する作用

IRF-1 と同様に癌抑制因子 p53 は転写活性化因子として機能する一方で様々な遺伝子のプロモーター活性を抑制す

ることが知られている。そこで、先ず IRF-1 とその変異体による各種プロモーター活性に対する作用を CAT アッセイにて検討した。プロモーターには SV40, CMV, RSV の各ウイルス由来プロモーター／エンハンサー及び細胞由来のものとして actin, elongation factor-1 $\alpha$ , c-myc, c-fos 各遺伝子のプロモーターを用いた。

#### [結果]

##### 1) IRF-1 及びその変異体の転写活性化能

IRF 結合部位を 4 回繰り返したレポーター遺伝子を用いた場合、酸性アミノ酸に富む領域を欠失する変異体 (mt2) は IRF-1 に比べ転写活性が約 50% と低く、一方塩基性アミノ酸に富む領域を欠失する変異体 (mt6) は IRF-1 に比べ約 4 倍高かった。さらに mt6 は IRF-1 と同様 IFN 誘導遺伝子のプロモーター (2', 5' A 合成酵素及び MHC クラス I 遺伝子) を活性化した。しかし IFN- $\alpha$  及び  $\beta$  遺伝子のプロモーターは mt6 ではほとんど活性化されなかった。

##### 2) IRF-1 の細胞増殖に対する作用

pIRF-1ER を高発現した細胞では、 $\beta$ -estradiol 非存在下 [ $^3$ H]-thymidine の取り込み及び細胞の増殖は ER のみを高発現した細胞 (control) と変わらなかったが、 $\beta$ -estradiol 存在下では [ $^3$ H]-thymidine の取り込みが減少し細胞数の増加が認められなかった。また IRF-1 の変異体の一つである mt6 について、同様に ER との融合遺伝子 (pmt6ER) を高発現した細胞を用いて調べた。その結果、mt6ER を高発現した細胞では  $\beta$ -estradiol 存在下 [ $^3$ H]-thymidine の取り込み及び細胞数は control と変わりなかった。

##### 3) IRF-1 のプロモーター活性に対する作用

用いたすべてのプロモーター活性は IRF-1 により、その発現量の増大に伴い抑制された。変異体の中では mt6 のみにこの抑制がみられなかった。IRF-1 の高発現は IFN の発現を誘導することが知られているので、産生された IFN を十分に中和できる量の抗 IFN 抗体存在下で同様の実験を行った。その結果、抗体存在下でも IRF-1 によるプロモーター活性の抑制がみられた。また IRF-1 によるプロモーター活性の抑制は、IRF-2 を同時に遺伝子導入することにより回復した。

#### [総括]

IRF-1 による遺伝子の発現には、その標的遺伝子によって塩基性アミノ酸に富む領域を必要とする機構と、必要としない機構が存在することが示された。今回の実験から、IFN- $\beta$  遺伝子は IRF-1 の塩基性アミノ酸に富む領域を必要とする機構によって活性化される遺伝子の一つと考えられる。IFN- $\beta$  遺伝子の上流領域には NF $\kappa$ B, ATF/CREB, Oct-1 の結合部位が同定されており、IRF-1 はこれらの因子と塩基性アミノ酸に富む領域を介して協調することも予想される。一方 IRF-1 を高発現した細胞では細胞増殖の抑制が認められ、mt6 を高発現した細胞ではこのような作用が認められなかった。また IRF-1 の発現は IRF-1 の DNA 結合部位を持たない遺伝子のプロモーター活性を抑制するのに対し、mt6 では抑制がみられなかった。このことから、IRF-1 による細胞増殖抑制作用とプロモーター活性の抑制には相関性が認められ、これらの作用にも塩基性アミノ酸に富む領域が重要な機能を担っていることが示唆された。さらに IRF-1 によるプロモーター活性の抑制について調べたところ、IRF-1 が転写活性化因子として機能することに基づくことが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は IRF-1 による遺伝子発現及び IRF-1 を介する IFN の生理作用を解明することを目的として、IRF-1 の変異体を作製し、IRF-1 が機能する上で重要なドメインの同定及び機能解析を行ったものである。先ず IRF-1 による転写制御の実験から、IRF-1 が転写活性化因子として機能するには IRF-1 の塩基性アミノ酸に富む領域を必要とする機構と必要としない機構が存在することを明らかにした。次に IRF-1 を高発現させた細胞では IFN の生理作用の一つである細胞増殖抑制が認められたが、IRF-1 の塩基性アミノ酸に富む領域を欠失した変異体ではこの作用が見られないことから、この領域を介して細胞増殖抑制が行われることを明らかにした。さらに IRF-1 の発現により IRF 認識配列を持たない遺伝子のプロモーター活性が抑制され、この IRF-1 の作用にも塩基性アミノ酸に富む領域が必要であ

ることを示した。このことから IRF-1 の塩基性アミノ酸に富む領域を介する機構による細胞増殖抑制作用とこのプロモーター活性の抑制には相関性が見られ、この領域が重要な機能を果たしていることを明らかとした。またこの作用は IRF-1 が転写活性化因子として機能することに基づく可能性を示した。この一連の研究から IRF-1 が機能する上で重要なドメインが明らかとなり、これは IRF-1 の機能を解明するうえで重要な知見と考えられ、今後の研究を方向づける意味で大変意義のある研究である。よって、この論文は学位論文として十分に価値のあるものと認められる。