

Title	Activation of IFN- β element by IRF-1 requires a post-translational event in addition to IRF-1 synthesis.
Author(s)	渡辺, 伸昌
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38958
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	わたなべ のぶ 伸 昌
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 1 2 6 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 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Activation of IFN- β element by IRF-1 requires a post-translational event in addition to IRF-1 synthesis. (IRF-1 による IFN- β 遺伝子のシスエレメント活性化には IRF-1 の合成に加えて翻訳後の変化を必要とする)
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

[序文]

ヒト β 型インターフェロン (IFN- β) 遺伝子は、通常は発現されていないが、ウイルス感染等により、一過的に強力な発現誘導が起こる。この転写活性化に必要とされる領域は、遺伝子の転写開始点より上流約 100 塩基内に存在し、その領域内には種々の転写因子、Interferon Regulatory Factor (IRF)-1, IRF-2, 及び NF κ B 等の結合配列が見出されており、各々が協調的に働くことにより遺伝子の発現が制御されていると考えられている。遺伝子導入実験等により、IRF-1 は IFN- β 遺伝子に対して転写活性化因子として機能することが明らかとされている。しかしながら、IRF-1 の発現様式と IFN- β 遺伝子の発現様式とを比較検討した結果、IRF-1 は、ウイルス感染時のみならず、IFN や TNF- α など種々のサイトカイン刺激によっても発現が同程度誘導されるにもかかわらず、これらサイトカイン刺激時における IFN- β 遺伝子の発現は、ウイルス感染時に比べ非常に弱いものであることが明らかとなった。従って、ウイルス感染時における IFN- β 遺伝子の発現誘導には IRF-1 の発現に加え、IRF-1 の修飾もしくは他の転写因子の誘導等が必要であることが示唆された。以上の考察を基に、ウイルス感染刺激による IFN- β 遺伝子の転写活性化機構を明らかにすることを目的とし、シスエレメントの詳細な解析、ウイルス誘導特異的エンハンサーに作用する DNA 結合因子の検索、及びその解析を行った。

[方法とその結果]

IFN- β 遺伝子の転写制御領域には IRF 結合部位及び NF κ B 結合部位があり、各々ウイルス感染による IFN- β 遺伝子の転写活性化に重要な役割を果たしていることが示されている。そこでまず、各々の結合部位を複数回繰り返した DNA 配列をシスエレメントとしてもつレポーター遺伝子を構築し、種々の刺激時における発現のレベルを比較検討した。NF κ B 結合部位をシスエレメントとしてもつレポーター遺伝子は、ウイルス感染時だけでなく、TNF- α 刺激によっても強い発現誘導が認められた。しかしながら、IFN- β 遺伝子の発現は TNF- α 刺激ではほとんど見られないことより、単に NF κ B の活性化のみでは IFN- β 遺伝子の転写誘導には不十分であることが示唆された。次に、IRF 結合部位を複数回繰り返した DNA 配列をシスエレメントとしてもつレポーター遺伝子では、IFN- β 遺伝子と同様、ウイルス感染によってのみ強い発現誘導が認められ、IFN や TNF- α などのサイトカイン刺激ではその発現は非常に弱いものであった。IFN, TNF- α 刺激は、ウイルス感染同様、IRF-1 の発現を誘導することより、上記の IRF 結合配列には、単に IRF-1 が合成されるだけでなく、ウイルス感染特異的なメカニズムが作用していることが示唆され

れた。我々はこの配列と IFN- β 遺伝子の制御配列とを比較し、両者とも IRF 結合部位を連続して2つ含んでいることに着目し以下の実験を行った。シスエレメントとして IRF 結合部位を1つもつ場合と、2つ連続してもつ場合とを比較した結果、2つもつレポーター遺伝子は、ウイルス感染特異的に強い発現誘導が見られたのに対し、1つしかもたないレポーター遺伝子は、IFN 刺激によってもウイルス感染刺激とほぼ同等の発現誘導が認められた。従って、IRF 結合部位を2つ含む DNA 配列が、ウイルス感染刺激特異的なエンハンサーとして機能する最小単位の一つであることが明らかとなった。IFN- β 遺伝子の制御領域には IRF 結合部位が2つ連続して存在することを考え合わせると、このウイルス感染特異的なエンハンサーの機能発現のメカニズムを解析することが、IFN- β 遺伝子のウイルス感染による転写誘導の機構を知るうえで非常に重要であると考えられる。そこで、このウイルス感染特異的なエンハンサーに作用する DNA 結合因子の検索をゲルシフト法を用いて行い、ウイルス感染時に特異的に検出される DNA 結合因子、V-IRF を同定した。以後その解析を行った結果、

1. V-IRF 活性の発現は、IFN- β 遺伝子の転写誘導と強く相関する、
2. V-IRF 活性の誘導は、IFN- β 遺伝子と同様、タンパク合成阻害剤、及びタンパク質リン酸化阻害剤により強く抑制される、
3. さらに DNA 競合実験により、V-IRF は、転写抑制因子である IRF-2 よりも、IFN- β 遺伝子の IRF 結合領域に対して高い親和性を示すことを明らかにした。また、グリセロール密度勾配遠心法、及び DNA-タンパクの UV クロスリンク実験による分子量測定により、V-IRF は複数のポリペプチド鎖からなるタンパク複合体であることが示唆された。さらに、V-IRF 活性はフォスファターゼ処理により消失することから、その活性はリン酸化により制御されていることが強く示唆された。最近、IRF-1 遺伝子を欠失したトランスジェニックマウスが作製されたが、このマウス由来の細胞では、二重鎖 RNA 刺激による IFN- β 遺伝子の発現は強く抑制されたのに対し、ウイルス感染刺激による IFN- β 遺伝子の発現は正常に起こることが明らかとなった。この結果は、IFN- β 遺伝子の発現には IRF-1 依存性と非依存性の機構があることを示唆しているが、このようなシステムにおいて今回同定した V-IRF がどのような役割を担っているか、現在詳細に検討を行っている。

[総括]

1. IFN- β 遺伝子の制御領域には、IRF 結合配列、及び NF κ B 結合部位が存在し、IFN- β 遺伝子の転写活性化に重要な役割を果たすことが示されているが、IRF-1 の発現、及び NF κ B の発現誘導のみでは IFN- β 遺伝子の転写活性化には不十分である。
2. IFN- β 遺伝子の制御領域には、IRF 結合配列が2つ連続して見いだされるが、IRF 結合部位を2つもつ DNA 配列は、ウイルス感染刺激に特異的なエンハンサーとして機能する。
3. 上記ウイルス感染刺激特異的なエンハンサーに結合する因子として、V-IRF を新たに同定し、その DNA 結合活性の発現が IFN- β 遺伝子の転写誘導に重要な役割を果たすものであることが示唆された。
4. V-IRF は複数のポリペプチド鎖からなり、その DNA 結合活性はリン酸化により制御されていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

β 型インターフェロン (IFN- β) 遺伝子は、通常は全く発現されておらず、ウイルス感染等の刺激により一過的に強力な転写誘導が起こることが知られている。IFN- β 遺伝子の転写制御領域に結合する核内因子として IRF-1、IRF-2 が同定され、その機能解析の結果、IRF-1 は IFN- β 遺伝子に対して転写活性化因子として機能することが明らかにされている。本研究ではまず、種々の刺激下における IFN- β 遺伝子と IRF-1 の発現様式とを比較検討し、単に IRF-1 が発現誘導されるのみではウイルス感染時に見られるような IFN- β 遺伝子の効率的な転写活性化には不十分であることを明らかにした。更に本研究では、ウイルス誘導特異的なエンハンサーとして機能するシスエレメントの詳細な解析に引き続き、このウイルス誘導特異的なエンハンサーに結合する細胞性因子を新たに見だし、性状解析を行った結果、この因子の発現はウイルス感染刺激等、IFN- β 遺伝子の効率的な誘導刺激によってのみ誘導され、IFN- β

遺伝子の転写活性化と非常に高い相関性を示すこと、更に、転写抑制因子である IRF-2 よりも IFN- β 遺伝子の転写制御領域に対して高い親和性を持つことを明らかにした。以上本研究により明らかにされた点は、この因子の発現誘導がウイルス感染時における IFN- β 遺伝子の転写活性化に重要な役割を担うことを支持するものである。一連の研究は IFN- β 遺伝子の発現制御機構の解明において、新たな展開を生み出した。たいへん価値のある研究であり、従って学位論文に値するものであると考えられる。