



Title	Transcriptional activation of the interleukin-6 gene by HTLV-1 p40tax through an NF- κ B-like binding site
Author(s)	村岡, 修
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38986
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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	むら おか おさむ 村 岡 修
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 1 7 7 6 号
学位授与年月日	平成 7 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	Transcriptional activation of the interleukin-6 gene by HTLV-1 p40tax through an NF- κ B-like binding site (IL-6 遺伝子は NF- κ B 様結合配列を介して HTLV-1 p40tax により活性化される)
論文審査委員	(主査) 教 授 平野 俊夫 (副査) 教 授 米田 悦啓 教 授 辻本 賀英

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

慢性関節リウマチ (RA) 患者の関節液中には IL-6 の産生亢進が認められ、急性期タンパク、リウマチ因子、高ガンマグロブリン血症といった RA の血液学的所見は、IL-6 の産生亢進より説明することができる。我々は、未知のウイルス由来トランス活性化因子が、IL-6 をはじめとする種々の内在性遺伝子発現を誘導して、RA の病態形成に関与していると考えている。事実、HTLV-1 感染患者に、RA 様の関節症状がおりうるということが報告され、一部のリウマチ患者で HTLV-1 陽性の症例が存在することが明らかになっている。また HTLV-1 pX 領域遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにおいて、RA に類似した関節炎が生じ、IL-6 の発現亢進が認められることも報告されている。しかしながら、大部分の RA 患者は HTLV-1 陰性である。我々は RA 患者の組織で HTLV-1 p40tax 様因子の発現の可能性を考えており、この未知のウイルス由来トランス活性化因子をクローニングする目的に適したアッセイ系を確立するために、HTLV-1 p40tax を使用してモデル実験を行なった。

【方法と成績】

発現ベクターに tax 遺伝子を組み込んだプラスミド、p-tax, をリン酸カルシウム法により導入した HeLa 細胞より全 RNA を抽出し、IL-6 gene をプローベに用いてノザンプロットを行なったところ、IL-6 mRNA の発現量に著明な増強が認められた。

そこで、IL-6 5' 上流領域をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流につないだ IL-6 p-luciferase と p-tax を HeLa および 293T 細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定すると HeLa で 8 倍、293T で 12 倍のルシフェラーゼ活性が検出された。したがって、p40tax は IL-6 プロモーターをトランスに活性化することがわかった。

次に様々な IL-6 5' 領域欠損ミュータントをルシフェラーゼ遺伝子につなぎ、同様にアッセイを行なったところ、5' 上流-108bp まで欠失させても 8 倍の活性が認められたが、-36bp まで欠失させると p40tax による活性化は 1.6 倍にまで低下した。この結果から、-36bp~-108bp の部分に p40tax による活性化に必須の領域が存在すると考えられた。

この -36bp~-108bp の部分には、NF- κ B 様結合配列 (IL-6 κ B サイト) が存在している。この配列に変異を導入すると、-36bp まで欠損させた場合と同程度にまで活性の低下が認められ、IL-6 κ B サイトが p40tax による活性化に必須なシスエレメントであることがわかった。

さらに、p40taxによるIL-6プロモーターの活性化にどのような因子が関与しているか解析するため、p-taxを導入したHeLaと293Tより核抽出物を得、IL-6 κ Bサイトをプローベとしてゲルシフトアッセイを行なった。その結果、p-tax導入によりシフトしたDNAタンパク複合体(complex A)を認め、DNA結合タンパクが誘導されることがわかった。さらにラベルしていないIL-6 κ Bサイトに競合させると、complex Aの形成はプローベの10倍量で完全に阻害されたことから、この反応はIL-6 κ Bサイトに特異的であることがわかった。

IL-6 κ Bサイトに結合するタンパクの性質を調べるため、IL-6 κ Bサイトに変異を加えたオリゴヌクレオチドを競合物として用い、同様のゲルシフトアッセイを行なった。IL-6 κ Bサイトの中央のTを一塩基だけ変異させた競合物では、wild typeと同様にプローベの10倍量でcomplex Aのバンドが消失した。中央の3塩基を変異させたものでは、200倍で消失が認められた。IL-6 κ BサイトのGGGとCCCを変異させたものでは200倍でも消失せず、さらにIL-6 κ Bサイトの上流半分を競合物とした場合には全く変化が認められなかった。以上のことから、p40taxによるcomplex Aの形成にはG及びC配列がより重要であることが明らかになった。このことはNF- κ Bで報告されている結果と同じであることから、p40taxにより誘導されるDNA結合タンパクもNF- κ Bであることが予想された。

そこで、抗p50および抗c-rel抗血清を用いてゲルシフトアッセイを施行すると、p-taxを導入した細胞ではHeLa、293Tともに、抗p50抗血清添加にて移動度の低い新たなcomplex Cを認めたが、抗c-rel抗血清では変化しなかった。この結果、p40taxにより誘導される新たなバンドの中にはp50様のタンパクが含まれていることがわかった。

【総括】

p40taxによりIL-6遺伝子の発現が誘導されること、それにはIL-6遺伝子5'上流に存在するIL-6 κ Bサイトが必須であることを明らかにした。さらにp40taxによりIL-6 κ Bサイトに結合するDNA結合タンパクが核内に誘導されること、このタンパクの結合にはIL-6 κ BサイトのG、C配列が重要であることを示した。さらに、IL-6 κ Bサイト結合タンパクは抗p50抗血清と反応することより、NF- κ Bファミリーに属することが明らかになった。また、抗p50抗血清に反応した複合体はcomplex Aの一部にすぎないことから、p50以外のDNA結合タンパクも作用していることが示唆された。

これらの結果より、RA様症状を引き起こすHTLV-1由来トランス活性化因子p40tax^{*}が、IL-6遺伝子を活性化させることが明らかになった。実際のRAでも、未知の原因ウイルスにより同様の機序が働いている可能性が考えられる。現在、我々は本研究で用いたIL-6 p-luciferaseと293T細胞の系を用い、RA患者組織より合成したcDNA発現ライブラリーからのIL-6遺伝子を活性化する因子の同定に努力している。

論文審査の結果の要旨

本論文はHTLV-1 p40taxがIL-6遺伝子の5'上流領域を活性化することを明らかにし、慢性関節リウマチの患者組織よりIL-6遺伝子のプロモーターを活性化させる因子をクローニングするためのアッセイ系を確立したものである。

p40taxがIL-6 mRNAの発現量を著明に増強させることを明らかにするとともに、IL-6 5'上流領域をルシフェラーゼ遺伝子につないだIL-6 p-luciferaseを用い、p40taxがルシフェラーゼ活性を上げることから、p40taxによりIL-6プロモーターが活性化されていることを明らかにした。さらにこの活性化にはIL-6 5'上流領域のNF- κ B様結合配列(IL-6 κ Bサイト)が必須のシスエレメントであること、ゲルシフトアッセイの結果からp40taxによりIL-6 κ Bサイトに特異的に結合するタンパクが核内に現われることを明らかにした。さらにこのタンパクが抗p50抗血清に反応することからp50様の因子を含むことを示した。

これらの結果より、ウイルス由来トランス活性化因子が、IL-6遺伝子を活性化させることが明らかになった。慢性関節リウマチ(RA)でも同様の機序が働いている可能性を考え、本研究結果に基づき、RA患者組織より未知のウイルス由来トランス活性化因子をスクリーニングするためのアッセイ系を確立した。

本研究は HTLV-1 p40tax が NF- κ B 様配列を介して IL-6 遺伝子を活性化することを示した。またここで確立された方法により, RA の原因が解明される可能性がある。以上の点から, 本論文は学位論文に値するものと認める。