



Title	E1A repression of IL-6 -induced gene activation by blocking the assembly of IL-6 response element binding complexes
Author(s)	武田, 卓
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39041
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、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	武 田 卓 ^{たけ だ たかし}
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 11817 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 医学研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	E1A repression of IL-6-induced gene activation by blocking the assembly of IL-6 response element binding complexes (E1A は, IL-6 応答領域結合因子形成阻害によって, IL-6 応答遺伝子活性化を抑制する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡田伸太郎 (副査) 教 授 平野 俊夫 教 授 辻本 賀英

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

IL-6 は, 免疫, 造血, 急性期反応などの生体防御系において重要な役割をはたしているサイトカインである。一方ウイルスは, 感染後, 数カ月から数年の長期にわたり, 感染細胞に存在する場合があります, 宿主の生体防御系に何らかの影響を及ぼし, 宿主と共存できる状態をつくりだしている。このようなウイルスの 1 つであるアデノウイルスの E1A 蛋白はアデノウイルス遺伝子を活性化し, 感染や宿主細胞の形質転換に必須であるだけでなく, 他の宿主細胞やウイルスの遺伝子発現を活性化, あるいは抑制する。抗ウイルス作用をもつサイトカインとして知られるインターフェロン (IFN) に対しては, その機能を阻止し, 宿主生体防御系を妨害しうることが報告されている。特に IFN- α においては, DNA 結合因子である ISGF3 γ に対する抑制効果が指摘されている。IFN が, JAK/TyK キナーゼ, STAT 転写因子群を使う, 新しいシグナル伝達路を用いることが明らかになっているが, 我々は junB 遺伝子の 5' 上流に IL-6 応答領域 (JRE-IL-6) を同定するとともに, JRE-IL-6 の活性化に至るシグナル伝達経路には, 急性期蛋白遺伝子 5' 上流の IL-6 応答領域 (APRE) への経路と同様に, JAK-STAT が関与していることを明らかにしてきた。本研究では, E1A が IL-6 による JRE-IL-6 及び APRE 活性化に至るシグナル伝達路を抑制することを明らかにするとともに, その機序を解析した。

【方法ならびに成績】

1. 人肝癌細胞株 HepG2 細胞で, CAT アッセイを用いて転写活性を測定した。リン酸カルシウム法を用い junB プロモーター (-581/+242) CAT 遺伝子を 5 型アデノウイルスの E1A 発現ベクターと同時に形質導入し, IL-6 による活性化に対する影響を検討した。Wild type 及び 12SE1A の発現は, junB プロモーターの IL-6 による活性化を抑制した。さらに JRE-IL-6, APRE を上流にもつ CAT 遺伝子を同様に形質導入し E1A の効果を検討したところ, IL-6, IFN- γ による活性化を抑制した。また, 12型アデノウイルスの E1A 同様の抑制効果を示したことから, この抑制が E1A の一般的な作用である可能性が示唆された。

2. E1A には種々の serotype に共通の 3 つの conserved region (CR) が存在し各領域が E1A の機能を担うとされている。これらの領域に欠失変異をもつ E1A の発現ベクターを用いて, 抑制を担う領域を検討した。その結果 CR2, CR3 を必要とせず CR1 を含む領域が必要であることが判明した。

3. E1A と IL-6 応答領域結合因子との直接の結合を検討した。JRE-IL-6, APRE をプローブとしたゲルシフトアッ

セイにおいて、IL-6 刺激した HepG 2 細胞の核蛋白に、大腸菌で産出した GST-E1A 蛋白を加えてもパターンに変化を認めなかった。即ち E1A は IL-6 応答領域結合因子に直接結合して抑制するのではないと考えられた。

4. ラット線維芽細胞株である 3Y1 細胞より作製された、E1A を恒常的に発現する E1A 3Y1 細胞を用いて、IL-6 シグナルのどの段階で、E1A が影響するかを検討した。親株である 3Y1 細胞では、IL-6 による JRE-IL-6, APRE の活性化を認めるのに対し、E1A 3Y1 細胞では、両 IL-6 応答領域の活性化を認めなかった。しかしながら IL-6 刺激によって junB mRNA の発現は誘導されることより、IL-6 レセプターを介して junB 遺伝子の JRE-IL-6 以外の IL-6 応答領域にはシグナルが正常に伝達していることが判明した。APRE をプローブとしたゲルシフトアッセイにおいて、E1A 3Y1 細胞では核、細胞質の両分画で IL-6 応答領域結合因子を認めず、E1A は、これらの因子の活性化あるいは産生そのものに抑制的に働くと考えられた。E1A による IFN- α シグナルの抑制は、IFN 応答領域 (ISRE) 結合因子である ISGF 3 複合体を構成する ISGF 3 γ の活性低下によると報告されており、IL-6 の場合にも、ISGF 3 γ の関与が想定された。しかしながら、正常の ISGF 3 γ 活性を持つ IL-6 非刺激の 3Y1 細胞蛋白を IL-6 刺激した E1A 3Y1 細胞蛋白に加えても、結合能の回復を認めず、IL-6 の場合の抑制メカニズムが ISGF 3 γ のような DNA 結合因子阻害だけではないことが判明した。

5. IL-6 応答領域結合因子の構成因子である STAT 蛋白の蛋白量について検討した。STAT に特異的な抗体を用いたウェスタンブロットにより、E1A 3Y1 細胞では、STAT 1, STAT 2, STAT 3 のそれぞれの蛋白量が、3Y1 細胞に比して著明に減少しており、これら STAT 蛋白の減少が、IL-6 誘導性の IL-6 応答領域結合因子活性の減少を説明すると考えられた。

【総括】

1. E1A は、2 つの IL-6 応答領域である JRE-IL-6, APRE に至る IL-6 シグナル伝達路に対し、抑制的に作用した。
2. E1A の形質転換作用に必須である CR 1 領域が、抑制において重要な役割をはたした。抗増殖作用を持つ IFN, IL-6 のシグナルを E1A が抑制することが、形質転換作用に相関する可能性が想定された。
3. E1A は、IL-6 応答領域結合因子に直接結合しないと思われた。
4. IL-6 応答領域結合因子が、E1A による抑制の標的と考えられ、その構成因子である STAT 転写因子群の蛋白量の減少が、IL-6 シグナル伝達路に対する E1A の抑制効果の原因となる可能性が示唆された。
5. 多くのサイトカイン、増殖因子が、JAK/Tyk キナーゼ、STAT 転写因子群を使うシグナル伝達路を用いることから、このような IL-6 シグナルに対する E1A の抑制効果は、ウイルス感染及び、形質転換のメカニズムを解明するうえで重要な意義をもつと思われる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、アデノウイルスの E1A 蛋白が、IL-6 による junB 遺伝子、急性期蛋白遺伝子プロモーター上の IL-6 応答領域 (JRE-IL-6, APRE) 活性化に至るシグナル伝達路を抑制することを明らかにし、その機序を解析したものである。

CAT アッセイを用いて junB プロモーター、JRE-IL-6, APRE の IL-6 による活性化を E1A が抑制することを明らかにした。また、E1A の形質転換作用に必須である conserved region 1 を含む領域が、この抑制において重要であることを明らかにした。ゲルシフトアッセイの結果、E1A が IL-6 応答領域結合因子には直接結合しないこと、E1A を恒常的に発現する E1A 3Y1 細胞では、IL-6 応答領域結合因子を認めないことを明らかにした。さらに、これらの因子を構成する STAT 転写因子に対する抗体を用いたウェスタンブロットの結果、STAT 転写因子群の蛋白量の減少を認め、E1A の抑制効果の原因となりうることが明らかとなった。

多くのサイトカイン、増殖因子が、IL-6 と類似した JAK キナーゼ、STAT 転写因子群を使うシグナル伝達路を用いることから、このような E1A の抑制効果は、ウイルスの持続感染及び、形質転換のメカニズムを解明するうえで重要な意義をもつと思われる。以上の点から、本論文は学位論文に値するものと認める。