

Title	Ets結合部位とCRE類似部位を介したインターロイキン-6によるJunB遺伝子の転写活性化
Author(s)	草深, 竹志
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39209">https://hdl.handle.net/11094/39209</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 href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/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	草 深 竹 志
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学 位 記 番 号	第 1 1 4 9 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 6 月 3 0 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Ets 結 合 部 位 と CRE 類 似 部 位 を 介 した インターロイキン-6 による JunB 遺 伝 子 の 転 写 活 性 化
論 文 審 査 委 員	(主 査) 教 授 岡 田 正 (副 査) 教 授 平 野 俊 夫 教 授 辻 本 賀 英

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目 的]

インターロイキン-6 (IL-6) は種々の細胞に対して多彩な機能を示し、また種々の疾患の病態形成に関与するサイトカインである。これらの多種にわたる IL-6 の作用機序を理解するためには、受容体結合後の細胞内シグナル伝達機構を分子レベルで解明することが重要である。IL-6 の初期細胞内シグナルに関しては、IL-6 が初期応答遺伝子の中でも比較的選択的に JunB や Nup475 を 15 分以内に転写レベルで活性化すること、またこの活性化にはチロシンキナーゼと H7 に感受性のある未知のキナーゼが関与することが明らかにされている。また JunB や Nup475 の活性化はリンパ系、骨髄系、さらに肝細胞系と広い細胞系にわたって認められ、IL-6 刺激により誘導される細胞反応の中でも比較的共通した事象である。そこで IL-6 受容体から核へのシグナル伝達を JunB 遺伝子を対象として解析し、JunB プロモーター内での IL-6 刺激に対する転写調節領域の同定と、そこに作用する転写因子の解析を目的とした。

#### [方法および結果]

まずマウス genomic ライブラリーより 5' 上流域を含む JunB 遺伝子を得、3kb の上流域の塩基配列を決定後、種々の長さの上流域を CAT ベクターに挿入し組換えプラスミドを作成した。これらの組換え CAT ベクターを、肝癌細胞株である HepG2 細胞に形質導入して CAT アッセイを行い、-194 から -87 の上流域に IL-6 応答領域が存在することを確認した。さらにこの部分を 25bp ずつの範囲で検討することにより、-149 から -124 の領域に限定することができ、これを JRE-IL-6 とした。この配列は Ets 結合部位 (CAGGAAGC)、ならびに CRE 類似の配列 (TGACGCGA) を含んでいた。そこでこれらの部分を変化させた変異プラスミドを作成し CAT アッセイを行ったところ、反応性は著しく低下し、IL-6 に対する反応を担うには、Ets 結合部位、CRE 類似部位が共に必要であることが示された。

次に、ゲルシフトアッセイを行なうことにより、Ets 結合部位、CRE 類似部位に結合する因子についての検討を行った。JRE-IL6 をプローブとした場合、特異的な複数の蛋白-DNA 複合体のバンドが形成された。これらのバンドの

ほとんどは Ets 結合部位を変異させたコンペティターで消失したが、CRE 類似部位を変異させたものでは競合されず、これらは JRE-IL6のCRE 類似部位に結合したものであることがわかった。また symmetric な Somatostatin CRE に、より高い親和性を持っており、これらの蛋白は、CREB/ATF ファミリーに含まれる蛋白である可能性が示唆された。

Ets 結合部位は保存し、CRE 類似部位やその周辺の配列を変異させたオリゴヌクレオチド (J4ets) をプローブとした場合、Ets 結合部位に特異的と考えられるバンドが出現した。すでに Ets 蛋白の結合することが知られている、MSVLTR, HTLV-1 LTR をプローブとした場合にも、同じ泳動位置にバンドが出現し、コンペティターによる特異性も J4ets の場合と同じであった。

またメチル化阻害実験を行ったところ、Ets 結合部位の core 部分にある2つのグアニン残基のメチル化が、蛋白の結合を阻害していた。この結果は Ets-1 と MSVLTR, あるいは HTLV-1 LTR との結合の場合、また PU.1 と SV40enhancer の PU box との場合に観察されるものと同一であり、ゲルシフトアッセイの結果と合わせて、JRE-IL6 の Ets 結合部位に結合する核蛋白が、Ets 蛋白のファミリー、あるいはこれと特異性の似た蛋白である可能性が示唆された。

さらに実際の蛋白として、CRE-BP1, Ets-1 を発現させた場合、それぞれ単独では4倍、あるいは5倍の転写活性化を示し、両者を同時に発現させた場合には14倍の転写活性化を示した。

[総括]

HepG2 細胞を用いて、IL-6 による JunB 遺伝子の転写活性化に対する検討を行い、以下の結果を得た。

1. IL-6 刺激の反応を受ける初期応答領域 (JRE-IL6) を同定した。この領域は Ets 結合部位 (CAGGAAGC), CRE 類似部位 (TGACGCGA) を含んでおり、IL-6 刺激による転写活性を示すにあたり、共に必要であった。
2. JRE-IL6 の Ets 結合部位には Ets 蛋白のファミリーが、CRE 類似部位には CREB/ATF のファミリーが結合することが示唆され、これらの一員としての CRE-BP1、Ets-1 はそれぞれ転写活性化能を示した。

## 論文審査の結果の要旨

インターロイキン-6は多彩な機能を示すサイトカインであるが、その作用機序を理解するためには、インターロイキン-6に始まるシグナル伝達を分子レベルで解明することが必要である。

本研究においては、JRE-IL-6と称された junB 遺伝子におけるインターロイキン-6に対する初期応答領域が同定され、転写活性を担うためにはここに含まれる Ets 結合部位、CRE 類似部位なる2つの転写因子結合領域が必須であることが確かめられた。さらに Ets 結合部位には Ets 蛋白のファミリーが、CRE 類似部位には CREB/ATF のファミリーが結合することが示唆され、実際にこれらの因子を発現させた場合、JRE-IL-6に作用し転写活性を有することが示された。

これらの知見は、インターロイキン-6の作用機序を理解する上で有用であり、本研究の内容は学位の授与に値すると思われる。