

Title	IL-6-inducible complexes on an IL-6 response element of the junB promoter contain Stat 3 and 36kDa CRE-like site binding protein (s).
Author(s)	小島, 裕正
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39844
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 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	こ じま ひろ ただ 小 島 裕 正
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 7 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 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 病 理 系 専 攻
学 位 論 文 名	I L - 6 - inducible complexes on an I L - 6 response element of the <i>junB</i> promoter contain Stat 3 and 36kDa CRE-like site binding protein (s). (<i>JunB</i> 遺 伝 子 プ ロ モ ー タ ー 上 の I L - 6 応 答 領 域 に 作 用 す る Stat と 協 調 し て 働 く 転 写 因 子)
論 文 審 査 委 員	(主 査) 教 授 平 野 俊 夫 (副 査) 教 授 辻 本 賀 英 教 授 米 田 悦 啓

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

インターロイキン-6 (IL-6) は免疫系, 血液系, 神経系, 肝臓等, 種々の細胞に対して細胞増殖や分化, アポトーシス等多彩な機能を示し, 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。多彩な作用を示す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Tis11を15分以内に転写レベルで活性化し, この活性化にはJak/Tykキナーゼと, H7に感受性の未知のキナーゼが関与することがわかっている。また, HepG2細胞において*junB*遺伝子プロモーター上のIL-6応答領域(JRE-IL6)は, ETS結合類似配列(JEBS)とCRE類似部位からなり, IL-6に対する応答にはどちらの部位も必須である。本研究ではJRE-IL6に作用する転写因子群の性状解析を目的として実験を行った。

【方法ならびに成績】

①IL-6によって活性化される, α_2 -macroglobulin 遺伝子プロモーター上のType II acute phase responsive element (APRE) に結合する転写因子とJRE-IL6中のJEBSに結合する転写因子は同じもので, Signal transducer and activator of transcription (Stat) ファミリーの転写因子であることがわかってきた。そこで, Stat1, Stat2で共通したアミノ酸部分に対応する縮合プライマーをつくり, IL-6刺激したヒト肝細胞株HepG2のpoly(A)⁺RNAをライブラリーとしてRT-PCR法によるStatファミリーのスクリーニングを試みた。その結果, Stat1, Stat2と異なる1つのクローンが得られた。更にPCR産物をプローブとして新規のヒトStat1類似cDNAを得たが, 同時期に発表されたStat3(APRF)と同一のものであることが判明した。ヒトStat3のC末702-770番目のアミノ酸部分とGSTとの融合蛋白を家兎に免疫して抗体を作成した。

②HepG2並びにマウスB細胞ハイブリドーマMH-60をIL-6で15分刺激した後, 核抽出液を得て, JRE-IL6をプローブとしたelectrophoretic mobility shift assay (EMSA)を行った。その結果, APREをプローブとして用いた時に見られるStat3のみからなる複合体よりも移動度の遅い複合体(JRE-IL6-BCs)を形成することがわかった。EMSA反応液中に抗Stat3抗体を添加するとJRE-IL6-BCsはスーパーシフトすることから, JRE-IL6-BCs中にはStat3が含まれることが示唆された。EMSAにおける種々の非標識オリゴヌクレオチドを用いた競合実験によりCRE類似配列結合蛋白が存在することを確認した。また, Collagenase T

REよりもSomatostatin CREにより高い親和性を持つことから、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。しかしながら既知のCREB/ATFファミリーに対する抗体を用いた実験からはCREB, CREM, ATF-1, ATF-2, ATF-3, ATF-4, Maf並びにJunファミリーとは異なるものと考えられた。また、ISGF3 γ の関与も否定的であった。

③JRE-IL6のCRE様配列に変異を加え、それらをプローブとして用いたEMSAにより複合体形成に与える影響を調べた。また、変異配列をminimal *junB*プロモーターとルンフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだレポーター遺伝子を構築し、HepG2細胞に遺伝子導入してIL-6刺激によって誘導される転写活性を調べた。その結果、Stat結合配列へのStat3の結合には影響がないCRE様配列の変異でも複合体の形成並びに転写活性化能の低下がみられた。

④JRE-IL6-BC中のCRE類似配列結合蛋白の分子量はUV架橋法により調べたところ36kDa (p36)であることがわかった。

⑤IL-6で活性化される遺伝子のプロモーターを調べたところ、マウス並びにヒトIRF-1遺伝子の5'プロモーター上のIL-6応答領域(IR/IRF-1)にもStat結合部位に隣接するCRE類似配列があることがわかった。IL-6で刺激したHepG2、並びにMH-60細胞の核抽出液をIR/IRF-1をプローブとしてEMSAを行った。その結果、JRE-IL6-BCと同じ移動度で複合体が形成され、この中にはStat3が含まれていた。EMSAにおいてJRE-IL6-BCはIR/IRF-1の非標識オリゴヌクレオチドによって競合阻害がかかることから、これらの複合体の構成成分は同じものであると考えられた。IR/IRF-1のCRE類似配列に変異を加えたものでは、EMSAにおける複合体の形成が低下し、HepG2細胞におけるIL-6応答性の転写活性も低下していた。

⑥Stat3が細胞質/核の両画分で結合活性をもつものに対してJRE-IL6-BCsは核画分でのみ活性が認められた。

⑦IL-6刺激したMH60細胞の核抽出液をIR/IRF-1をリガンドとしたDNAアフィニティー法によって精製したものの中にStat以外にp36が含まれていた。p36をSDS-PAGEゲルから抽出し、再生処理後、APREをリガンドとしたDNAアフィニティー法によって精製したStat蛋白とインキュベートしたのち、IR/IRF-1をプローブとしてEMSAを行った。その結果、JRE-IL-6BCに相当するバンドの形成が認められp36が複合体の構成成分であることが確認された。

【総括】

①IL-6刺激によりJRE-IL6への結合が誘導される複合体(JRE-IL6-BCs)が存在することがわかった。JRE-IL6-BCはStat結合配列に結合するStat3とCRE類似配列に結合する36kDaの蛋白(p36)からなることがわかった。

②Stat結合部位やCRE類似配列に変異を与えたJRE-IL6では複合体の形成が認められず、これに呼応して転写活性の低下が確認された。即ちIL-6応答には、StatとCRE類似配列結合蛋白との複合体形成による協調作用が重要であることが明らかになった。

③Stat結合部位と隣接するCRE類似配列をもつ他のIL-6応答領域、即ち、IRF-1プロモーター上のIR/IRF-1においても同様の複合体形成が機能的にも重要であることを示した。これらのことからStat-CRE結合蛋白複合体形成はStatの作用の仕組みとして重要なものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

多彩な作用を示すサイトカインであるIL-6の作用機序を解明するためには、受容体結合後、遺伝子群活性化までの細胞内シグナル伝達路を明らかにしていくことが重要である。本研究はIL-6によって誘導される初期応答型遺伝子*JunB*の5'プロモーター領域のIL-6応答領域(JRE-IL6)に結合する転写因子群について解析を行ったものである。

JRE-IL6は、ETS結合部位とCRE配列から構成されており、両配列がIL-6応答に必要である。又、ETS結合部位は、Stat3の低親和性の結合部位でもある。

ゲルシフトアッセイにおいてIL-6刺激によって誘導されJRE-IL6に結合する複合体(JRE-IL6-BC)が存在することを明らかにした。また、JRE-IL6-BCにはStat結合配列に結合するStat3転写因子以外にCRE類似配列に結合する36kdの蛋白が含まれること、両者の協調作用が複合体形成並びに転写活性に重要であることを明らかにした。

更には、StatとCRE結合蛋白の協調作用による複合体の形成並びに転写制御はIRF-1遺伝子プロモーター上のIL-6応答領域でも認められることを明らかにした。

本研究はStatの転写活性化機構の一つとして、Statと他の転写因子が協調作用を示すことによって結合配列への親和性や、転写活性をあげるといった形があるということを初めて示した論文であり、その成果は高く評価され、学位論文として十分に価値のあるものと認められる。