



Title	Identification of Multiple Transcription Factors, HLF, FTF, and E4 BP4, Controlling Hepatitis B Virus EnhancerII
Author(s)	石田, 永
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41860
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	石 田 永 ^{いし だ ひさし}
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 6 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Identification of Multiple Transcription Factors, HLF, FTF, and E 4 BP 4, Controlling Hepatitis B Virus Enhancer II (B型肝炎ウイルスエンハンサーIIを制御する転写因子 HLF、FTF、 および E 4 BP 4 の同定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 堀 正二 (副査) 教 授 林 紀夫 教 授 山西 弘一

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

B型肝炎ウイルスエンハンサーII (HBV EnII) は肝細胞特異的に働くシス領域であり、HBV ゲノム内の4ヶ所のプロモーター (CP、SPI、SPII、XP) の転写に関与している。SPI、SPIIからはHBs抗原の鋳型となる2.4/2.1kb RNAが、XPからはX蛋白の鋳型となる0.8kb RNAが転写される。CPからは2種類の3.5kb RNA (プレコア RNA、プレゲノム RNA) が転写される。プレコア RNAからはHBe抗原が産生され、またそれより約30塩基短いプレゲノム RNAからはコア蛋白およびポリメラーゼ蛋白が産生される。このRNAは逆転写によるゲノム DNA の鋳型にもなることからウイルス複製に重要なRNAと考えられ、これらRNAの産生にEnII活性が強く関与している。またEnII領域にはHNF 1、HNF 3、HNF 4、SP 1、FTF、C/EBPなどの転写因子が結合して転写を活性化するとされているが、他方未知なる転写因子の関与も示唆されている。そこでEnIIの活性に重要となる領域について検討し、結合する転写因子の同定、解析を試みた。

【方法】

EnIIの複数の deletion mutantを組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを作成し、肝癌細胞株 HepG 2 に導入後ルシフェラーゼ活性を測定して、EnII活性の責任領域を決定した。また転写活性化に重要な領域について、HepG 2の核蛋白を用いてゲルシフトアッセイを行った。次に酵母 one-hybrid 法を用いて、ヒト肝組織の cDNA ライブラリーからこの領域に結合する因子の同定を試みた。得られた因子を *in vitro* translation 法にて合成し、EnII領域との結合についてゲルシフトアッセイにて検討した。さらに、その因子の強発現ベクターを用いてルシフェラーゼアッセイを行い、EnIIに対する作用について検討した。HBV 遺伝子発現に対する影響をみるため、因子の発現ベクターとHBVの発現ベクターをHuH 7に導入し、HBe抗原、HBs抗原、3.5kb RNA、2.4/2.1kb RNAの発現を測定した。3.5kb RNAのうちプレコア RNA、プレゲノム RNAについてはプライマーエクステンション法にて解析した。

【成績】

EnII領域のうち1640-1771を組み込んだものではルシフェラーゼ活性は15.8倍に上昇し、1640-1659を欠失させると、4.57倍と約3.5分の1に活性は低下した。従って、十分な活性を示すには1640-1659の配列が必要であると考えられた。次に、この領域を含む1640-1663をプローブとして、HepG 2の核蛋白でゲルシフトアッセイを行った所、特異的なバンドの形成を認めた。1640-1663を bait とした酵母 one-hybrid 法では、3種の転写因子、HLF

(hepatic leukemia factor)、FTF (fetoprotein transcription factor)、E 4 BP 4 が同定された。すべての転写因子はゲルシフトアッセイで1640-1663と特異的な結合を示した。レポーターアッセイでは1640-1663の領域の存在により、HLF、FTF では転写が活性化され、一方E 4 BP 4 では転写は抑制された。HBV 遺伝子の発現に関しては、FTF はHBe 抗原、HBs 抗原とともに増加させたが、HLF はHBe 抗原のみを増加させた。E 4 BP 4 はどちらにも影響を与えなかった。さらにRNA の発現レベルを見ると、HBe 抗原の鋳型となる3.5kb RNA、HBs 抗原の鋳型となる2.4/2.1kb RNA はともに各抗原の発現と同様の傾向を認めた。プレコア RNA、プレゲノム RNA の検討では、HLF を導入した場合、プレゲノム RNA の発現の上昇の程度がプレコア RNA に比し強かった。

【総括】

EnII には種々の転写因子が結合し、その総和として活性が示されるものと考えられ、HBV 増殖の肝親和性の1つは肝細胞内で発現するこれら転写因子のプロフィールによって規定されているものと考えられた。HBV 1640-1663 の配列はこうしたEnII の転写活性の制御に関わる領域の1つであり、この領域に結合する転写因子としてHLF、FTF、E 4 BP 4 が同定された。HBV の転写に関し、FTF は3.5kb RNA、2.4/2.1kb RNA をともに上昇させることから、1640-1663の領域はFTF と結合することによってエンハンサーとして作用し、一方HLF は3.5kb RNA のみを上昇させることから、この領域はHLF と結合するとCP 特異的に働くコア上流調節領域として作用すると考えられた。さらに、HLF のCP に対する作用はプレゲノム RNA 産生に特に強く働くことより、ウイルス複製に重要な因子であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

B型肝炎ウイルスは肝細胞特異的に増殖し、急性および慢性肝炎、さらには肝細胞癌の発生に密接に関与するウイルスである。この肝細胞への特異性は、1つにはエンハンサーⅡの活性によるものと考えられているが、この活性化機構およびそれに関与する転写因子に関しては十分な解析がなされていない。

本論文では、エンハンサーⅡ内の転写活性化に重要となる領域を新たに同定し、既知の転写因子との相互作用について詳細な解析を行った。さらに、その領域に結合する3種類の転写因子HLF、FTF、E 4 BP 4 を同定した。これらの因子がエンハンサーⅡの転写活性化能を制御し、ならびにB型肝炎ウイルスの増殖についても強い影響を及ぼすものであることを明らかにした。本研究で得られた知見は、B型肝炎ウイルスの増殖機構を解明するものであり、また転写因子を調節することにより、ウイルス増殖を制御する可能性を示唆するものである。

従って、本論文は学位に値するものと認める。