

学 位 論 文 題 名

IL-6 遺伝子の発現における転写因子

NF-IL6 とNF- κ Bの相乗作用

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

Interleukin-6(IL-6)は、B細胞分化因子として免疫系に作用するだけでなく、肝細胞による急性期蛋白合成の制御、増血幹細胞の増殖分化、神経細胞の分化などにも関与する重要な生理活性因子である。またIL-6の発現異常を伴う各種疾患—ヒト骨髄腫、関節リウマチ、メザンギウム増殖性腎炎などが報告され、IL-6遺伝子の発現の調節を明らかにすることが、こうした疾患の分子レベルでの病因解明のため必要となった。

IL-6遺伝子のプロモーター領域には、IL-6遺伝子の発現を調節する転写活性化因子NF-IL6の結合部位と共に、重要な転写因子として研究が進んでいるDNA結合蛋白NF- κ Bの結合モチーフが存在する。またNF-IL6、NF- κ B共に、急性期反応・炎症・増血の際に働く他のサイトカインの転写制御部位にも結合し、感染や組織障害に対する生体制御機構において、主要な役割を担う因子である

こうしたことより、NF- κ BはIL-6遺伝子の発現を調節する重要なメディエーターではないかと考え、IL-6遺伝子の発現調節においてはNF-IL6とNF- κ Bが相乗効果をもつと推測した。今回、NF-IL6NF- κ B両方の結合部位をもつIL-6 プロモーター領域をレポーター遺伝子として、NF-IL6とNF- κ B (p50/p65: NF- κ Bはp50、p65の2つのサブユニットからなる)の発現ベクターをJurkat細胞に一過性に発現させて、CAT (chloramphenicol acetyltransferase) assay を行ない、2つの転写因子の相乗作用を検討した。

II. 材料と方法

細胞：ヒトT細胞株Jurkat細胞は、10%のウシ胎児血清を含むRPM

11640 にて培養した。

NF- κ Bサブユニットp105 (p50) cDNAのクローニング：p50の前駆体 p105cDNA は、5' 側の1.5kbp部分と3' 側の1.5kbpの部分とを、

ヒトp105の塩基配列をもとにPCR法にて、マウス骨髄腫DNAを鋳型にして作成した。この1.5kbpの5' 側、3' 側のフラグメントをプローブとして、human placenta cDNA library をスクリーニングし、3' プローブ、5' プローブ共に強陽性の4個のクローンを与えて、Puc18プラスミドにサブクローニングした。このうち開始コドンの上流-98から下流+2700までの2.8kbpのフラグメントと、+1030から+3700までをコードする2.7kbpのフラグメントを構築してp105cDNAをえた。p50は、p105の+53 (SmaI site) から+1679 (XbaI site) までの1.6kbpに、polya denylation signal sequence をつけて構築した。

発現ベクターとリポータープラスミドの構築：p50cDNAは cytomegalovirus promoter をもつ発現ベクターBCMG/Neoに組込んだ。p65はCDM8に発現させたものを用いた。NF-IL6はcytomegalovirus promoter の下流に組み込み発現させた。レポーター遺伝子としては、ヒトIL-6遺伝子の上流-180から+22までのIL-6プロモーター領域 K18をCAT遺伝子の前につないで、K18-CAT として用いた。これは-158から-145にNF-IL6の結合部位を1コピーもち、-73から-64にNF- κ Bの結合モチーフを1コピーもち。レポーター遺伝子の5' 欠落ミュータントとして、ヒトIL-6プロモーター領域 K9をCAT遺伝子の前につけた。K9-CATは5' 側のNF-IL6の結合部位は欠落していて、NF- κ Bの結合モチーフのみをもつ。

DNAトランスフェクションとCATアッセイ：Jurkat細胞は、トランスフェクション当日、対数増殖期に入るように調整した。ひとつのアッセイあたり 5×10^6 個の細胞を用い、DEAE-デキストラン法にて、レポーター遺伝子とNF-IL6、p50、p65の発現ベクターを各々トランスフェクションした。48時間培養して回収し、細胞抽出液のCAT活性を解析した。

III. 結果と考察

1. NF-IL6とNF- κ B (p50/p65) のトランスフェクションによるCATアッセイ：IL-6プロモーターK18-CAT遺伝子1 μ gとNF-IL6、p50、p65の発現ベクターを各々0.5 μ gずつトランスフェクションし、CATアッ

セイを行なった。リポーター遺伝子のみをトランスフェクションしたときアセチル化されたスポットはみられず、Jurkat細胞ではNF-IL6、NF- κ B結合部位に結合する内在性の因子が極めて少ないことがわかった。リポーター遺伝子と共にNF-IL6だけをトランスフェクションした場合、NF- κ B (p50/p65) のサブユニットを等量ずつトランスフェクションした場合も、CAT活性はかなり低かった。NF-IL6とNF- κ Bを同時にトランスフェクションすると、非常に強いアセチル化されたスポットがみられCAT活性は40%にも上昇した。これは、NF-IL6とp50/p65が、リポーター遺伝子K18-CATに相乗して作用し、CAT遺伝子の強い発現が起きたことを示している。NF-IL6のみのトランスフェクションではCAT活性が低いことにより、IL-6遺伝子の転写が必要となった場合NF-IL6以外の因子の関与が予想され、本実験によってIL-6遺伝子の発現調節機構では、NF-IL6とNF- κ Bが相乗作用していることが示された。NF- κ Bは核内では、ふたつのサブユニットp50とp65のヘテロダイマーとして存在し、p50はDNA binding・dimerization domain をもち、DNA結合能は高い。一方p65は、transactivator domain と阻害物質I κ Bとの結合部位をもつが、DNA結合能はかなり低い。NF-IL6とNF- κ Bの相乗作用におけるNF- κ Bのサブユニットの関与をみるため、NF-IL6とp50をトランスフェクションして、CATアッセイを行なった。CAT活性は軽度上昇し、p50がホモダイマーとしてNF- κ Bモチーフに結合し、NF-IL6と共働したか、内在性のp65またはc-relなどRel-Ankyrin family に属する他の因子が、p50と解合してp50/p65、p50/c-rel コンプレックスをつくり、共働作用を示したとも推測される。次に、transactivator domain はもつが、DNA結合能は弱いサブユニットp65のみを、NF-IL6とトランスフェクションした結果であるが、アセチル化された強いスポットがみられ、NF- κ Bのサブユニットp65単独であってもNF-IL6との相乗効果を認めた。これはp50の場合のように、内在性の因子の関与だけを考えても説明はつかず、p65のDNA結合親和性が低いことよりも、p65がどのようにしてNF-IL6と共働作用をとったかはたいへん興味深い。

また、NF-IL6と共にトランスフェクションするp50とp65の量と比を変化させてCAT活性の増減をみると、最もCAT活性が高かったのはp50、p65を等量用いた場合であり、p50/p65のヘテロダイマーによる作用の関与が大きいことを示す。p50のトランスフェクションは少量であってもp65が一定量あれば、CAT活性は高いこと、逆にp50は一定量、p65が少量のトランスフェクションではCAT活性は低下してしまうことか

らも、NF-IL6とNF- κ BのIL-6遺伝子の発現機構における共働作用ではp65の働きが主要であることがわかった。

2. 5' 欠落ミュータントK9-CAT遺伝子を用いたCATアッセイ: ミュータントリポーター遺伝子K9-CATは、NF-IL6の結合部位は欠落していて、NF- κ Bの結合モチーフ1コピーだけをもつ。このK9-CATとNF-IL6、NF- κ B (p50/p65) をトランスフェクションした結果では、野生型のK18-CATでみられたような、CAT活性の上昇はみられず、その値は低かった。この実験より、NF-IL6がその結合部位に存在していなければNF-IL6とNF- κ Bの共働作用はおこらないことがわかった。

IV. 結語

IL-6遺伝子の発現調節における転写因子NF-IL6とNF- κ Bの相乗作用をCATアッセイにて検討した。

1. NF-IL6、NF- κ BはIL-6遺伝子の転写活性化において相乗的に作用した。
2. その作用には主にNF- κ Bのサブユニットp65の関与が重要であった。
3. NF-IL6がNF-IL6結合部位になれば、NF- κ Bとの相乗作用は起らなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 牧 田 章

副 査 教 授 葛 巻 暹

転写活性化因子である NF-IL 6 と NF- κ B は、種々の感染や組織障害に対する生体の防御機構のなかで、急性期蛋白の合成や炎症反応の調節上、重要な役割をもつ DNA 結合蛋白である。また、IL 6 遺伝子のプロモーター領域には、NF-IL 6 結合部位とともに NF- κ B 結合モチーフが存在する。このことから、IL 6 遺伝子の発現調節において、転写因子 NF-IL 6 と NF- κ B が相乗効果をもつとの仮説を検証しようとした。

IL 6 プロモーター領域に CAT 遺伝子をつけてリポーター遺伝子とし、NF-IL 6 と NF- κ B (p 50 / p 65) の発現ベクターを Jurkat 細胞に一過性にトランスフェクションして、CAT アッセイを行った。

その結果、NF-IL 6 と NF- κ B のトランスフェクションによって、著明なクロールアンフェニコールのアセチル化がみられ、CAT 活性は40%まで上昇した。次に NF-IL 6 と NF- κ B のサブユニット p 65 のみのトランスフェクションによる CAT アッセイにても高い CAT 活性がみられた。また、NF-IL 6 結合部位が欠落しているミュータントをリポーター遺伝子とした場合には、NF-IL 6 と NF- κ B のトランスフェクションによる CAT 活性の上昇はみられなかった。

これらの実験から、IL 6 遺伝子の発現調節において、DNA 結合蛋白 NF-IL 6 と NF- κ B が相乗作用を持つことが示された。また、この相乗作用は NF-IL 6 と NF- κ B のサブユニット p 65 の関与によるところが大きいことを示唆している。NF-IL 6 結合部位に NF-IL 6 が存在していなければ、こうした相乗作用は生じないことも示された。

以上の口答発表に際し、葛巻教授から生理的条件下でも二つの転写因子は必要か、組織、細胞特異性はあるか、CAT 活性低下機序における NF- κ B の意義につき、牧田教授からは NF- κ B は他にどのような系を調節するか、その機序につき、長嶋教授からは CAT アッセイの細胞選択性にまつわる問題点、ウイルス感染でも成立するかにつき、宮崎教授からは他の IL 6 産生細胞での検討、抑制効果の有無、IL 6 の生物学的活性などにつき質問があったが、申請者は概ね妥当に答えた。

また、葛巻、牧田両教授から簡別に審査を受けたが、合格との御返事をいただいている。

以上により、本研究は、博士の学位に相当するものと認めた。