

氏名（本籍）	仁 木 <sup>まさる</sup> 賢
学位の種類	博 士 （ 医 学 ）
学位記番号	医 博 第 1 1 0 0 号
学位授与年月日	平 成 4 年 3 月 27 日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学研究科 （博士課程）病理学系専攻
学位論文題目	Multistep Regulation of Enhancer Activity of the 21-Base-Pair Element of Human T cell Leukemia Virus Type I （ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-I）の 21塩基配列のエンハンサー活性の多段階制御）
	（主 査）
論文審査委員	教授 菅 村 和 夫 教授 岡 本 宏 教授 今 野 多 助

## 論文内容要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I) は、人で最初に発見されたレトロウイルスで、成人 T 細胞白血病の原因となる。本ウイルスゲノムの発現、複製は、ウイルスゲノム 5' 側の long terminal repeat (LTR) の U3 領域内にあるエンハンサーにより支配されている。このエンハンサー中には、少なくとも 2 種類のエンハンサーエレメントが存在する。一つは、U3 内に 3 回繰り返り存在する、21bp エレメントで、第 2 は、2 番目と 3 番目の 21bp エレメントの間に存在する、NP- $\kappa$ B のコンセンサス配列に似たエレメントである。両エレメントとも、HTLV-I の特異的産物である、転写促進因子 p40<sup>tax</sup> の作用を受ける。しかし、このエンハンサーエレメントが活性化される機構は、まだ不明な点が多い。

p40<sup>tax</sup> は、そのみで細胞を癌化させる活性を持つ。この p40<sup>tax</sup> の活性は、p40<sup>tax</sup> の転写促進作用が、自分自身のエンハンサーばかりでなく、細胞側遺伝子のエンハンサーにも作用し、その結果、細胞増殖に必要な遺伝子の発現に変調をきたし、発癌に導くと考えられている。しかし、p40<sup>tax</sup> は直接、エンハンサー DNA には結合せず、p40<sup>tax</sup> は最終的に、細胞内の核内転写因子に影響を与えると考えられるが、その機構は不明である。

本研究では、HTLV-I エンハンサーエレメントの一つ、21bp エレメントの活性化機構を分子レベルで詳細に検討した。

我々は、21bp エレメントは、cAMP-responsive element (CRE) 配列を持ち、CRE binding protein (CREB) 様因子が結合すること。さらに、21bp エレメントは、p40<sup>tax</sup> 以外に、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる forskolin により活性化されるが、TPA にては活性化されないことをすでに示している。

本研究では、21bp エレメントの p40<sup>tax</sup>、forskolin による活性化機構を明らかにするため、21bp エレメントの種々の欠失変異株を用いて、ゲルシフトアッセイ、ならびに、CAT アッセイを行った。その結果、p40<sup>tax</sup> による 21bp エレメントの活性化、forskolin による活性化とも CREB 様因子の CRE への結合が必須であることを証明した。さらに、CREB 様因子の 21bp エレメントへの結合は、p40<sup>tax</sup>、forskolin には影響されないが、TPA がその結合を著しく促進させることを見出した。即ち、TPA は、21bp エレメントへの CREB 様因子の結合能を高めるが、21bp エレメントの活性を上昇させず、逆に、forskolin は、CREB 様因子の結合には影響を及ぼさないが、21bp のエンハンサー活性を高めるという結果を得た。さらに、TPA と forskolin の同時刺激により、21bp エンハンサー活性の相加的な上昇が見られた。これらのことは、21bp エレメントの活性化は、CREB 様因子の 21bp エレメントへの結合と、その DNA-タンパク複合体の活性化という、全

く異なる二段階の機構により制御を受けているものと考えられる。

さらに、21bp エLEMENTの欠失変異株は、p40<sup>max</sup> と forskolin に異なった反応性を示した。p40<sup>max</sup> の刺激に反応するためには、21bp エLEMENTのほぼ全域が必要であるのに対して、forskolin による刺激においては、21bp エLEMENT内の CRE の構成単位である TGAC motif 1 個でも十分であった。21bp エLEMENTを p40<sup>max</sup> と forskolin により同時に刺激すると、p40<sup>max</sup> 単独の刺激で得られる最高の活性よりも非常に高い活性を示した。従って、p40<sup>max</sup> と forskolin は CREB 様因子の21bp エLEMENTへの結合には、影響を与えないが、異なった機序によって、21bp エLEMENTを活性化しているものと考えられた。

細胞染色体中に組み込まれた HTLV-I ゲノムは、このように p40<sup>max</sup> を含む異なった刺激に対し、同一のエンハンサーが反応する機構を持ち、ウイルス増殖の機会を増していると推測され、ひいては発癌への確率を増加する方向に作用しているものと考えられる。

## 審査結果の要旨

本論文は、HTLV-I 21bp エLEMENTの活性化には、CREB 様因子の結合が必須であること。ならびに、この活性化は、CREB 様因子の結合と、その DNA-タンパク複合体の活性化という、二段階の機構の異なる制御を受けていることを証明したものである。

HTLV-I は、ヒトで最初に発見されたレトロウイルスで、成人 T 細胞白血病の原因ウイルスである。本ウイルスゲノムの発現、複製は、5' 側の LTR の U3 領域にあるエンハンサーに支配されている。エンハンサー中には、少なくとも 2 種類の異なったエンハンサー ELEMENT が存在し、両者とも、HTLV-I の特異的産物の一つである転写促進因子 p40<sup>tax</sup> の作用を受ける。しかし、そのエンハンサー ELEMENT が活性化される機構は不明な点が多い。本論文では、HTLV-I エンハンサー ELEMENT の一つ、21bp ELEMENT の活性化機構を分子レベルで詳細に検討した。

論文提出者らは、21bp ELEMENT は、CRE 配列を持ち、CREB 様因子が結合し、p40<sup>tax</sup> ならびに、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる forskolin により活性化されるが、TPA には活性化されないことをすでに示していた。本論文では、21bp ELEMENT の p40<sup>tax</sup>、forskolin による活性化機構を明らかにするために、21bp ELEMENT の種々の欠失変異株を用いて、ゲルシフトアッセイ、ならびに、CAT アッセイを行った。その結果、p40<sup>tax</sup> による 21bp ELEMENT の活性化、forskolin による活性化とも CREB 様因子の結合が必須であることを証明した。さらに、CREB 様因子の 21bp ELEMENT への結合は、p40<sup>tax</sup>、forskolin には影響されないが、TPA がその結合を著しく促進させることを証明した。さらに、TPA と forskolin の同時刺激により、21bp エンハンサー活性の相加的な上昇が見られた。これらのことは、21bp ELEMENT の活性化は、CREB 様因子の 21bp ELEMENT への結合と、その DNA-タンパク複合体の活性化という、全く異なる二段階の機構により制御を受けているものと考えられる。次に、21bp ELEMENT の欠失変異株は、p40<sup>tax</sup> と forskolin に異なる反応性を示すことを明らかにした。p40<sup>tax</sup> の刺激に反応するためには、21bp ELEMENT のほぼ全域が必要であるのに対し、forskolin による刺激においては 21bp ELEMENT 内の CRE の構成単位である TGAC motif 1 個で十分であった。又、21bp ELEMENT を p40<sup>tax</sup> と forskolin により同時刺激すると、p40<sup>tax</sup> 単独の刺激で得られる最高の活性よりも非常に高い活性を示した。従って、p40<sup>tax</sup> と forskolin は異なった機序によって 21bp ELEMENT を活性化しているものと考えられる。

p40<sup>tax</sup> はそれのみで細胞を癌化させる活性を持つ。この p40<sup>tax</sup> の活性は、自身のゲノムのみならず細胞側因子のエンハンサーにも転写促進作用を及ぼすことによると考えられる。従って、本論文で明らかになった 21bp ELEMENT の活性化の機構は、細胞癌化のメカニズムの解明にとって重要であり、本論文は博士号授与に値する研究とみなす。