

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 芦 澤 有 紀

本研究は IL-5 の作用特異性の発揮に大きく寄与していると考えられる IL-5R α 鎖の B 細胞や好酸球特異的な発現調節機構を解明するために、mIL-5R α 鎖遺伝子のプロモーター領域の解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. mIL-5R α 鎖の発現を誘導することが知られている抗 CD38 抗体非存在下 (-) および存在下 (+) で培養した脾臓 B 細胞を用いて、5'RACE 法により転写開始点を同定した結果、mIL-5R α 鎖遺伝子にはこれまで報告されていた転写開始点 (Exon1a) の 1kb 下流に新たな転写開始点 (Exon1b) が存在することが明らかになった。また、Exon1b からの転写が抗 CD38 抗体架橋刺激によって Exon1a よりも 3 倍程度強く誘導されることが示唆された。
2. 2 つの転写開始点を含む -581~+1105bp の DNA 断片を順次欠失させてホタルルシフェラーゼ cDNA の上流に結合させたレポーターコンストラクトを複製し、種々の細胞株に導入してプロモーター活性を測定した結果、-250~-115 領域が mIL-5R α 鎖陽性細胞特異的な転写活性化の調節に関与していることが示唆された。また、Exon1b 近傍の領域は細胞非特異的なプロモーター活性を有していると考えられた。
3. -250~-115 領域に結合する調節因子が存在するかどうかをゲルシフトアッセイにより探索した結果、2 種類の核内タンパク質-DNA 複合体 (C-I、C-V) が mIL-5R α 鎖陽性 B 細胞で顕著に認められた。オリゴヌクレオチドによる競

合阻害実験と抗体によるスーパーシフト解析から、C-I 複合体には E12/E47 が含まれることが示唆された。C-V 複合体の形成は Sp1、C/EBP β および Oct-2 のコンセンサス配列で約 50%、-144~-115 領域で 80%以上競合阻害され、抗 C/EBP β 抗体、抗 Sp1 抗体により部分的にスーパーシフトされた。これより、C/EBP β 、Sp1、Oct-2 および-144~-115 領域に結合する未同定の転写因子が複合体形成に関与することが示唆された。

4. -250~-115 領域に存在する E12/E47、C/EBP β 、Sp1 および Oct-2 のコンセンサス配列に変異を導入した場合のプロモーター活性の変化を調べた結果、E12 および E47、C/EBP β 、Sp1、Oct-2 のすべてが協調的に作用して転写活性化を正に調節していることが示唆された。

以上、本論文は mIL-5R α 鎖遺伝子に複数の転写開始点が存在することを明らかにし、Exon1b からの転写は抗 CD38 抗体架橋刺激によって誘導されることを示した。また、B 細胞における mIL-5R α 鎖遺伝子の発現調節には-250~-115 領域が関与しており、そこには E12 および E47、Sp1、C/EBP β 、Oct-2 および未同定の転写因子が結合し協同的に作用して発現を調節していることも示した。本研究は、未だ明らかにされていない mIL-5R α 鎖遺伝子の細胞特異的な発現制御機構の解明およびこれら転写因子の相互作用の理解に大きく貢献するものと思われ、学位の授与に値するものと考えられる。