Activation of the Interleukin-6 Gene by Inflammatory Lymphokines : Evidence for Involvement of Protein Kinase A and C Independent Signal Transduction Pathways

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8240

金沢大学十全医学会雑誌　第99巻　第6号　1144－1155（1990）

炎症性サイトカインによるインターロイキン-6遺伝子の活性化機構：プロテインキナーゼAあるいはCを介さないシグナル伝達系の関与

金沢大学がん研究所病態生理部（主任：山本健一教授）
見　供　克　之
（平成2年12月17日受付）

Inflammatory lymphokine regulatory factor (ILRF) の誘導は，細胞質に構成的に存在するILRFがinterleukin-1 (IL-1)/tumor necrosis factor (TNF) の刺激によって，その局在が核内に変化することによって起こり，タンパク質の新たな合成を必要としない．現在のところ，IL-1/TNFレセプターから核内因子までのシグナル伝達経路については，あまり解明されていない．本研究では，IL-1/TNFによるIL-6遺伝子活性化において，プロテインキナーゼA，あるいは，プロテインキナーゼCが関与しているかどうかを，chloramphenicol acetyltransferase (CAT) アッセイによるIL-6遺伝子転写活性の測定，ゲル移動度シフトアッセイによるILRFの定量，IL-6CAT messenger RNAの定量によって調べた．まず，線維芽細胞においてフォルスコリンや12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) でプロテインキナーゼAの経路やプロテインキナーゼCの経路を活性化してILRFの誘導を調べたがILRFの著しい誘導はみられなかった．プロテインキナーゼCの経路が用いた細胞で正常に働いていることは，TPA反応エレメントをプローブに用いて，activator protein-1 (AP-1) の誘導をゲル移動度シフトアッセイで確認した．次に，プロテインキナーゼAあるいはCの阻害剤の存在下でIL-1/TNF誘導効果を検討した．その結果，阻害剤存在下でもIL-1/TNFのシグナルはILRFに伝達され核に移行し，IL-6遺伝子の転写を活性化した．マウス前B細胞では，プロテインキナーゼAやCの経路を介してnuclear factor-kB (NF-kB) が誘導されていることが示されている．しかしながら，今回用いた線維芽細胞のようにリンパ球以外の細胞ではIL-1/TNFのシグナルは，プロテインキナーゼAやCの経路以外の経路を介して核へ伝達される可能性が示唆された．IL-1/TNFは複数のシグナル伝達経路の中から，細胞種によって異なった経路を選択してILRFを含むNF-kB様転写因子を誘導していると考えられた．

Key wards IL-1, IL-6, NF-kB, signal transduction, TNF

生体は，感染，組織傷害，免疫異常に際して，マクロファージがinterleukin-1 (IL-1) とtumor necrosis factor (TNF) を産生して炎症反応や免疫系を調節して恒常性を保っている．これらのサイトカインは，その多様な生物活性によって，生体防御機構において重要な役割を果たしている[1)~4)]．興味深いことに，IL-1とTNFは互いに異なったレセプターを介して細胞に作用するにもかかわらず，その生物活性は，きわめて類似している[2)]．たとえば，両サイトカインは，IL-1, IL-2, TNF, IL-6, IL-8などのサイトカインの誘導，発

Abbreviations: AP-1, activator protein-1; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; DEAE, diethylaminoethyl DMEM, Dulbecco's modified eagle medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; DNA, deoxyribonucleic acid; DTT, dithiothreitol; DETA, ethylenediaminetetraacetic acid; GTC, guanidine thiocyanate; HEPES, hydroxyethylpiperadine-N'-2-

熱活性，プロスタグランジン合成促進，コラーゲナーゼ合成促進，c-myc, c-fos の誘導などの共通した活性を示す[1)~4)]．このことは IL-1 と TNF の細胞内シグナル伝達機構が非常に類似しているか，あるいは，同じ経路を介している可能性を示唆している．

IL-1/TNF のシグナルが細胞内で，どのような経路を介して核内の遺伝子に伝達されているかということを調べるために，本研究では，IL-1/TNF で転写が活性化される IL-6遺伝子を用いた[5)6)]．IL-1/TNF のシグナルに応答する IL-6 遺伝子プロモーター領域内のシス・エレメントは，inflammatory lymphokine responsive element (ILRE) と呼ばれる．ILRE は，転写因子 nuclear factor-kB (NF-kB) の結合する DNA 配列と相同性が高い (図1)．また，ILRE に特異的に結合する転写因子 inflammatory lymphokine regulatory factor (ILRF) は NF-kB と同一か，あるいは，類似タンパク質と考えられ，IL-1/TNF の刺激によって核内に移行する[7)]．

NF-kB は，免疫グロブリンk鎖のエンハンサー・エレメント kB に結合する転写因子として見い出された[8)]．B細胞やマクロファージでは核内に局在しているが，それ以外の細胞では細胞質に局在していて．刺激に応じて核内に移行して種々の遺伝子の転写を活性化する．図1に示すように，IL-6, simian virus 40 (SV40)，主要組織適合複合体 (MHC) クラスI，クラスII，IL-2, IL-2 レセプター，β-インターフェロンなどの遺伝子の転写調節領域に kB エンハンサーと相同性の高いシス・エレメントがある[9)10)]．NF-kB は，細胞質内で，inhibitor-kb (IkB) と結合して不活性の状態にある[11)]．前B細胞のマウス70Z/3では，12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) やフォルスコリンの刺激で NF-kB が細胞質から核へ移行することによって誘導される[9)12)]．NF-kB の核への移行は，プロテインキナーゼAやCによって IkB がリン酸化されて，NF-kB が解離することによって起こると報告されている[9)13)]．

IL-6 遺伝子の kB 様エレメント (ILRE) と結合するタンパク質因子は，細胞質内で不活性の状態にあり，DNA 結合特異性と細胞内局在において NF-kB と区別することはできなかった[7)]．ILRF が NF-kB と同一物質であるならば，IL-1/TNF の刺激による ILRF の核内へのを移行とそれに続く IL-6遺伝子の転写活性化において，プロテインキナーゼAやCが関与している可能性がある．また，IL-1/TNF のシグナルがプロテインキナーゼAあるいはCの経路を介する場合があることも報告されている[12)14)15)]．

今回，リンパ球ではなく線維芽細胞を用いて，IL-1/TNF による ILRF (NF-kB 様転写因子) の誘導を調べたところ，リンパ球における NF-kB の誘導とは異なるシグナル伝達経路が関与している結果を得たので報告する．

材料および方法

I．試薬類

実験に使用した試薬および酵素は，下記より購入した．

制限酵素，Klenow ポリメラーゼI (東洋紡，大阪)；ラジオアイソトープ標識化合物 (Amersham,

IL-6, ILRE	GGGATTTTCCC
NF-kB (Ig, SV40, HIV)	GGGACTTTCC G/A
MHC	GGGGATTCCCC
IL-2 receptor	GGAATCTCCCT
IL-2	GGATTTCACCT
β-interferon	GGAATTTCCCA

Fig. 1. Siquense of IL-6 ILRE and related NF-kB binding motifs in the ILRE (7), kIg gene (8), SV40 virus (39), type 1 human immunodeficiency virus (HIV) (40), class I major histocompatibility complex (MHC) gene (39), IL-2 receptor gene (40), IL-2 gene (10), β-interferon gene (26).

ethanesulfonic acid; HIV, human immunodeficiency virus; IkB, inhibitor-kB; IL, interleukin; ILRE, inflammatory lymphokine responsive element; ILRF, inflammatory lymphokine regulatory factor; MHC, major histocompatibility complex; NF-kB, nuclear

Buckinghamshire,英国); poly (dI-dC)・poly (dI-dC), diethylaminoethyl (DEAE)-デキストラン (Pharmacia, Uppsala,スウェーデン); Bradford 試薬 (Bio-Red, Richmond,米国); piperazine-N, N'-bis 2-ethanesulfonic acid (PIPES) (半井化学, 京都);ホルムアミド, Nonidet P-40 (NP-40) (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg,米国); dimethyl-sulfoxide (DMSO), フォルスコリン, スペルミジン, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA),リボヌクレアーゼ T1 (Sigma, St. Louis,米国);チオシアン酸グアニジン (Fluka, Buchs,スイス); ペニシリン, ストレプトマイシン, タイロシン (Flow, McLean, 米国);塩化セシウム, リボヌクレアーゼ阻害剤, transfer RNA (tRNA), T 7ポリメラーゼ, デオキシリボヌクレアーゼI, リボヌクレアーゼA, プロテイナーゼK (Boehringer Mannheim, Postfach, 米国) の製品を使用した. 特に会社名の記載のない試薬は, 和光純薬 (大阪) の製品を使用した.

組み換え型ヒト IL-1αは大日本製薬の山田博士より, 組み換え型 TNF αは旭化成の伊藤博士より供与された.

II. 細胞培養

マウス線維芽細胞株L細胞は Colten 博士より, ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞は中西博士より供与された.

L細胞, HeLa 細胞の培養には, ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle medium, DNEM) (日水製薬, 東京) に, 56°Cで30分間処理して非働化した10%ウシ胎児血清 (Gibco, New York, 米国), 2 mM L-グルタミン, 0.2%炭酸水素ナトリウム, 50 units/ml ペニシリン, 50μg/ml ストレプトマイシン, 50μg/ml タイロシン, 2.5μg/ml ファンギゾンを添加して用いた. 細胞は, 37°Cで5%二酸化炭素, 95%空気の気相中で培養した.

III. IL-6 遺伝子転写調節領域を chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 構造遺伝子に接続した組み換えプラスミドの作製

ヒト IL-6 遺伝子ゲノム・クローンは, Sehgal 博士より供与されたヒト IL-6 complementary DNA (cDNA) をプローブとして, ファージ EMBL3 ゲノム・ライブラリー (旭化成, 伊藤博士より供与) から同定した. 転写開始点より下流14塩基対の XbaI 消化 DNA 断片を, CAT 構造遺伝子をもつプラスミド pBLCAT3 (Schuzt 博士より供与) の XbaI 部位に正方向に組み込んでクローニングした. この pIL-6CAT2.5を HhaI で切断して, pIL-6CAT225 (−225塩基対〜+14塩基対) を作製した. さらに, Bal31ヌクレアーゼを用いて pIL-6CAT225の 5' 端を欠失させて, pIL-6CATD59と pIL-6CAT72を作製した.

合成オリゴヌクレオチドは, DNA シンセサイザー (Applied biosystem, Foster, 米国) で合成した. 合成 ILRE, SV40kB は, T4 ポリヌクレオチドキナーゼで

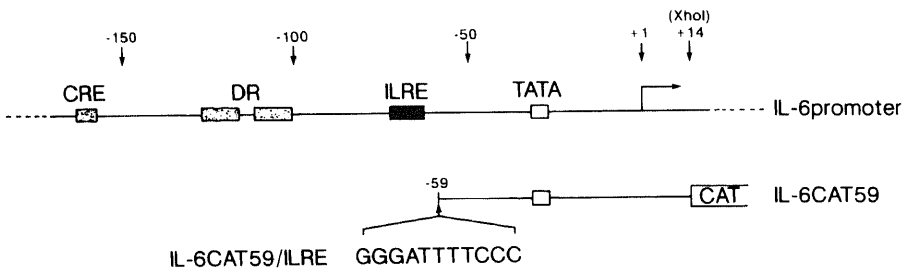

Fig. 2. The structures of the IL-6 promoter and IL-6CAT chimeric plasmids, IL-6CAT/ILRE. Locations of the follwing cis-elements are indicated: CRE, cAMP responsive element (from-163 to 158); DR, direct repeats (from-128 to-101); ILRE, inflammaftory lymphokine responsive element (from-73 to-63); TATA, TATA box element (from-32 to-25). The major transcription initiation site of the human IL-6 gene is indicated by a horizontal arrow (+1). Synthetic ILRE (GGGATTTTCCCC) is treated with kinase, anealed, and inserted at the BamHI site (-59) of the plasmid IL-6CAT59, creating the plasmid IL-6CAT59/ILRE.

factor-kB; NP-40, nonidet P-40; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; RNA, ribonucleic acid; cRNA, complementary RNA; mRNA, messenger RNA; SV40, simian virus 40; TNF, tumor necrosis factor; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate

処理した後，アニーリングした．さらに，Klenow ポリメラーゼIによって両端を平滑末端に修復し，BanHI リンカー(東洋紡)を接続した．BamHI 部位を利用して，合成 ILRE 1個，あるいは合成 SV 40 kB 1個を pIL-6CAT 59の5'端に組み込んでT4 DNA リガーゼで連結して，pIL-6CAT 59 ILRE (図2)と pIL-6CAT 59 SV 40 kB を作製した．

Ⅳ．プラスミド DNA の細胞への導入

細胞は DNA 導入の24時間前に，直径10 cm デッシュあたり 3×10^6個ずつ植えた．以後の培地は，全て血清を含まない DMEM を使用した．DEAE-デキストラン法[16]によって，デッシュあたりプラスミド DNA 20μg/DEAE-デキストラン混合液 2 ml〔25mM tris (hydroxylmethyl) aminomethane (Tris)－塩酸緩衝液，pH 7.4，137mM 塩化ナトリウム，5 mM 塩化カリウム，0.6mM リン酸水素ナトリウム，DEAE-デキストランの最終濃度，500μg/ml〕を添加後，室温で30分間静置した．培地 8 ml を加えて，CO_2インキュベータ内で90分間静置した．培地を吸引除去後，DNA 導入の効率を上げるため，10% DMSO を含む培地 4 ml を加え，室温で2分間処理した．DMSO 除去後，10ml の培地を加え，CO_2インキュベーター内で24時間培養した．IL-1 (21ng/ml) あるいは，TNF (34ng/ml) を加え，さらに24時間培養した．この細胞を回収して CAT アッセイあるいはリボヌクレアーゼ・マッピングに用いた．

Ⅴ．Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) アッセイ

CAT アッセイは，Gorman らの方法[17]に従って以下のように行った．直径10cm デッシュから回収した細胞に80μl の0.25M Tris-塩酸緩衝液，pH 7.8を加え，超音波処理によって細胞膜を破壊し，細胞抽出液を調製した．この細胞抽出液のタンパク質濃度は，Bradford 試薬で定量した．タンパク質量に換算して50から200μg の細胞抽出液を含む120μl の反応液〔Tris-塩酸緩衝液，pH 7.8，0.1μ Ci ^{14}C-クロラムフェニコール，4 mM acetyl-coenzyme A (CoA)〕中で，37°C，30分間反応させた．1 ml の酢酸エチルを加えて反応を止め，クロラムフェニコール及びアセチル化されたクロラムフェニコールを抽出した．この酢酸エチル溶液を真空乾燥させた．残渣を20μl の酢酸エチルを加えて再び溶かし，シリカゲルの薄層 (Merck, Rahway，米国) にスポットし，クロロホルム：メタノール (95：5) の溶媒系で，40分間展開した．展開後，薄層を風乾し，X線フィルムでオートラジオグラフィーを行い，アセチル化クロラムフェニコールの放射活性で CAT 活性を測定した．

Ⅵ．ゲル移動度シフトアッセイによる DNA 結合タンパク質の同定

1．^{32}P 標識 DNA プローブの作製

プローブに用いた DNA 断片は，プラスミド pIL-6CAT 72の5'端を HindIIIで,3'端を XhoI で消化して得た．ILRE を含むこの断片を (α-^{32}P)-dCTP を用いて Klenow ポリメラーゼIで3'末端標識を行い，5%ポリアクルアミドゲルで電気泳動を行い精製した．

2．核粗抽出液の調製

対照の抽出液は無処理の細胞から，IL-1, TNF 処理の抽出液は，それぞれのサイトカインで30分間刺激した細胞から，Dignam らの方法[18]に従って調製した．約10^8個の細胞を遠心して集め,phosphate buffered saline (PBS) に懸濁し洗浄後，細胞容量の5倍量の緩衝液A〔10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, (HEPES), pH 7.9, 1.5mM 塩化マグネシウム，10 mM 塩化カリウム，0.5mM dithiothreitol (DTT)〕に懸濁し，4°Cで10分間静置した．以下の操作は全て4°Cで行った．この細胞懸濁液を Dounce 型ホモジナイザー (Kontes, Vineland，米国) に移し，Bペッスルを20～30回往復させ，細胞膜を破壊した．細胞破砕液は500×gで10分間遠心し，核と細胞質分画に分離した．

細胞質分画に，その容量の0.11倍の割合で緩衝液B (0.3M HEPES, pH 7.9,1.4M塩化カリウム，30mM 塩化マグネシウム) を加え混合後100,000×gで60分間遠心した．得られた上清を緩衝液D〔20mM HEPES, pH 7.9,20%グリセロール，0.1M塩化カリウム，0.2mM ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA)，0.5mM phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF)，0.5mM DTT〕に対して透析して平衡化した．

核分画は，25,000×gで20分間遠心し，上清の細胞質分画をできるだけ完全に取り除いて得た．約10^8個の細胞から得らえた核分画あたり 500μl の緩衝液 C (10mM HEPES, pH 0.7,25%グリセロール，0.42M塩化ナトリウム，1.5 mM 塩化マグネシウム，0.2mM EDTA,0.5mM PMSF,0.5mM DTT) を加え，ホモジナイザーを用いて核を懸濁後，30分間攪拌して核タンパク質を抽出した．この抽出液を25,000×gで30分間遠心し，得られた上清を緩衝液Dに対し4時間透析して平衡化した．透析終了後，核粗抽出液と細胞質抽出液は，それぞれ25,000×gで20分間遠心して沈殿を除去した．抽出液のタンパク質濃度を Bradford 試薬を

用いて測定し，使用時まで−80°Cで保存した．

3．ゲル移動度シフトアッセイ

反応液19μl (20 mM HEPES, pH 7.9, 50mM 塩化カリウム，0.2mM EDTA, 10%グリセロール，2%ポリビニルアルコール (重合度500), 2μg poly (dI-dC)・poly (dI-dC), 1mM DTT, 3μg 核粗抽出液または3μg 細胞質抽出液) を氷中で10分間反応させた．次に，この反応液に1μlの3'末端標識 DNA プローブ (約1ng，放射比活性2〜5×10^7cpm/μg) を加え混合し，室温で30分間反応させた[19]．この反応液20μlを4%ポリアクリルアミドゲルを用いて，4°C，定電圧180Vで2〜3時間電気泳動した．泳動緩衝液には，22mM Tris-ホウ酸緩衝液を用いた．泳動後，ポリアクリルアミドゲルを Whatman 3MM ろ紙に移して乾燥させ，X線フィルムで15〜24時間オートラジオグラフィーを行い，そのプローブの移動度より DNA 結合タンパク質の同定を行った．

Ⅶ．IL-6CAT messenger ribonucleic acid (mRNA) の定量

1．組み換えプラスミドのL細胞への導入

Rous sarcoma virus (RSV) 由来の構成的なエンハンサーを CAT 構造遺伝子の5'端に接続した pRSVCAT 5μg を，pIL-6CAT59ILRE 10μg とともに細胞に導入することによって，各デッシュ間の DNA 導入の効率の違いを補正できるようにした．プラスミド DNA を導入してから24時間後，50μM H7 存在下または非存在下の細胞を IL-1 (21ng/ml), TNF (34ng/ml) で2時間刺激した．

2．全 RNA の調製

全 RNA の調製は，Chirgwin らの方法[20]に従って以下のように行った．0.5%ラウリルサルコシルナトリウム，25mM クエン酸ナトリウム，0.1M 2-メルカプトエタノールを含む4Mチオシアン酸グアニジン (guanidine thiocyanate, GTC) 液，pH 7.0，3 ml に，回収したL細胞を溶解した．この GTC 液中の DNA を細胞破砕機を用いて切断した．ベックマン (米国) SW 50.1ポリアロマーチューブに2 ml の5.7M 塩化セシウム，0.1M EDTA，0.2%ジエチルピロカルボネート，pH 7.0を入れ，その上に細胞を溶解した GTC 液を重層した．15°C，1×10^5gで12時間遠心後，上清のタンパク質，DNA の層を除去し，沈殿の RNA を95%エタノールで2回洗浄した．エタノールを風乾後，RNA を 0.3ml の蒸留水に溶解し，200 mM 塩化ナトリウム，2.5倍容量のエタノールを加え，−20°Cで保存した．

3．リボヌクレアーゼ・マッピング

IL-6CAT 遺伝子の IL-6 遺伝子プロモーター XbaI 部位 (−225塩基対) から CAT 構造遺伝子 EcoRI 部位 (+250塩基対) までの DNA 断片をプラスミド pSPT 18に組み込んだ．HindIII で消化したこのプラスミドを鋳型として，T7ポリメラーゼと (α-^{32}P)-dUTP を用いて complementary RNA (cRNA) を合成した．全 RNA と cRNA をハイブリッド形成させた後，リボヌクレアーゼAおよびリボヌクレアーゼT1により1本鎖部分を消化した[21]．尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し，オートラジオグラフィーにより保存された2本鎖 RNA の断片を分析した．

成 績

Ⅰ．CAT アッセイにおける IL-6CAT 59ILRE の誘導活性の検出

NF-kB のシグナル伝達と比較する目的で，IL-6CAT 59に合成 ILRE を接続した組み換えプラスミドを DEAE-デキストラン法で，マウス線維芽細胞株L細胞に導入した．この細胞をそれぞれ IL-1 (21 ng/ml), TNF (34 ng/ml), TPA (50 ng/ml), フォルスコリン (10μM) で24時間刺激後，CAT 活性を測定した (図3)．IL-6CAT 59 ILRE は，IL-1, TNF の刺激で CAT 活性の上昇を示した．ILRE を欠く IL-6C-

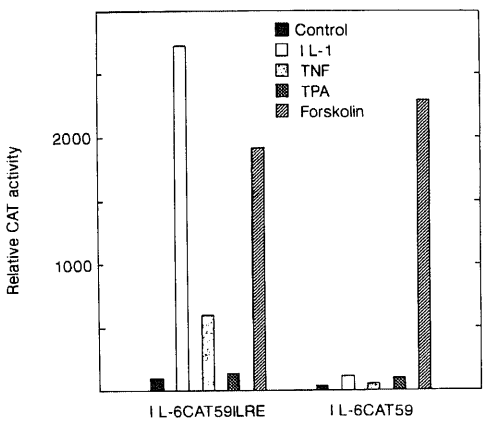

Fig. 3. Neither TPA nor forskolin mimics the IL-1/TNF action on the IL-6CAT expression. Test plamids (IL-6CAT59ILRE and IL-6CAT-59) were transfected into L cells, and the cells were stimulated with IL-1 (21 ng/ml), TNF (34 ng/ml), TPA (50 ng/ml) or forskolin (10 μM) for 24 hours. CAT activities were determined and expressed relative to the basal CAT activity from the plasmid IL-6CA-T59ILRE, which was set at a value of 100.

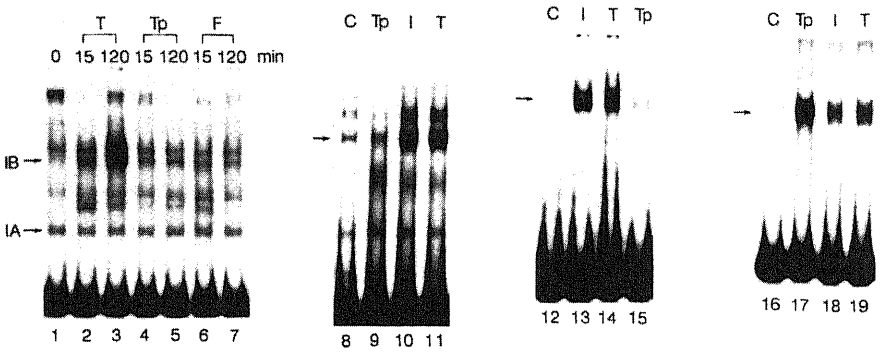

Fig. 4. Electrophoretic mobility shift assay. Nuclear extracts from unstimulated (0 min) L cells or from cells stimulated with TNF (T), TPA(Tp) of forskolin (F) for 15 or 120 min were analyzed with the probe spanning the IL-6 sequence from-73 to +14 (lanesd 1-7). Nuclear extracts from unstimulated (C) HeLa cells or from cells stimulated with TPA, IL-1 (I) or TNF for 30 min were analyzed with either the IL-6 probe (lanes 8-11), the SV40 kB probe (lanes 12-15) or the TPA responsive element (TRE) probe (16-19). DNA/protein complexes of lanes 1-7 denoted ILRF-A (IA) and ILRF-B (IB) that was competitive specifically with excess unlabeled ILRE. IA, but not NF-kB like nuclear factor, was present constitutively in the nucleus, although IB which was similar to NF-kB was present in the cytoplasm and tranlocated to the nucleus upon stimulation. The arrows of lanes 8-11 and lanes 12-15 denoted ILRF/DNA complex. The arrow of lanes 16-19 denoted AP-1/DNA complex.

AT 59では，IL-1, TNF の刺激によって CAT 活性は上昇しなかった．IL-6CAT 59，IL-6CAT 59 ILRE ともに TPA には反応しなかった．フォルスコリンの刺激に対しては，両者ともに CAT 活性の上昇がみとめられフォルスコリンの刺激には，ILRE は関係ないことがわかった．この結果から線維芽細胞における IL-1/TNF のシグナル伝達経路は，TPA やフォルスコリンの刺激に置き換えることができないことがわかった (図 3)．

II．ゲル移動度シフトアッセイによる転写因子の検出

TPA やフォルスコリンの刺激で ILRF が核内に誘導されるかどうかを調べる目的でゲル移動度シフトアッセイを行った．図 4 と図 5 において，ILRF と ILRE を含む DNA 断片の複合体は IB で示した．アッセイに核粗抽出液を用いると，ILRF は IL-1 (図 5) と TNF (図 4 の 3) で誘導された．一方，L細胞を TPA やフォルコリンで刺激しても ILRF に相当するバンドの著しい誘導はみとめられなかった (図 4 の 4 から 7)．また，ヒト子宮頸がん細胞株の HeLa 細胞においても同様の結果だった (図 4 の 8 から 9)．IL-1 または TNF で HeLa 細胞を刺激した場合，ILRF (図 4 の 8 の矢印) は誘導されたが，TPA ではほ

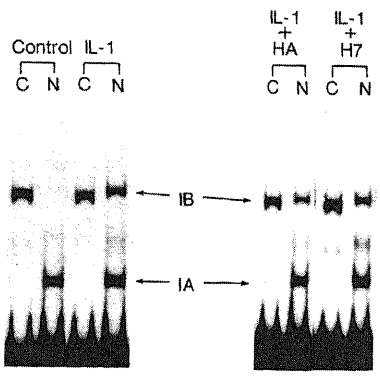

Fig. 5. Effects of protein kinase C inhibitors on the translocation of ILRF from the cytoplasm to the nucleus. Nuclear (N) and cytosolic (C) extracts from unstimulated (control) L cells or from cells treated with IL-1 (21 ng/ml) for 30 min in the presence or absence of HA (50 μM) or H7 (50 μM) were analyzed with the IL-6 probe (from−73 to +14): cytosolic extracts were treated with DOC and NP-40 prior to electrophoretic mobility shift assay. DNA/protein complexes denoted IA an IB are as described in Fig. 4.

とんど誘導されなかった．ILRE と相同性の高い SV40 の kB エレメント (図1) をプローブとして，IL-1, TNF, TPA それぞれで刺激後の HeLa 細胞の核粗抽出液を用いてゲル移動度シフトアッセイを行った (図4の12から15)．ILRE に結合する因子 (ILRF) と同様に，kB エレメントに結合する因子 (NF-kB) も IL-1/TNF で誘導された (図4の13と14) が，TPA では誘導されなかった (図4の15)．

次に，この実験条件で TPA によってプロテインキナーゼCが活性化されていることを確かめる目的で activator protein-1 (AP-1) の誘導を調べた．AP-1 は，プロテインキナーゼCのシグナル伝達経路の核内受容タンパク質であることが知られている[22)23)]．図4の16，17に示すように，HeLa 細胞において TPA の刺激で AP-1 は著明に誘導された (図4の17の矢印)．また，報告されているように，AP-1 は IL-1 (図4の18) や TNF(図4の19) によっても誘導された．AP-1 が誘導されたことから，TPA で細胞を刺激する実験条件が不適当ではないことが確かめられた．

Ⅲ．ILRF 誘導におけるプロテインキナーゼ阻害剤の影響

1．ゲル移動度シフトアッセイ

IL-1/TNF による ILRF の核内への誘導におけるプロテインキナーゼ阻害剤の影響を調べた．阻害剤 H8 (N-〔2-(methylamino) ethyl〕-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride) は主にプロテインキナーゼAを阻害する．H 7〔1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride〕は主にプロテインキナーゼCを阻害する．

図5に示すように，対照では ILRF (IB) は細胞質 (cytosol, C) に局在し，核 (nuclear extract, N) では，ほとんど検出されなかった．細胞質では NF-kB は，IkB と複合体を形成して不活性の状態にあり，DNA 結合能はないことが知られている．この複合体は，界面活性剤である0.8% sodium deoxycholate (DOC) と0.75% NP-40 で処理することによって解離し DNA 結合能がゲル移動度シフトアッセイで検出できるようになった (図5の細胞質：C)．図5の ILRF

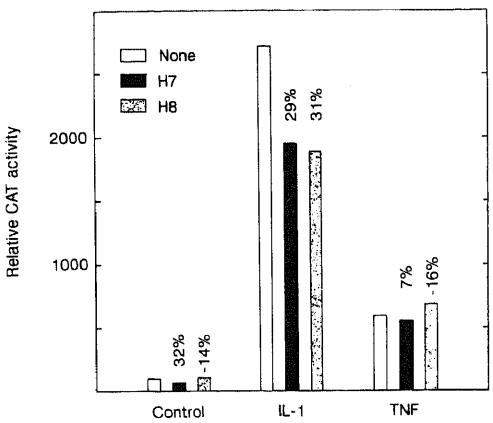

Fig. 6. Effect of H7 and H8 on the activation of the IL-6CAT genes by IL-1 and TNF. After transfection with IL-6CAT59/ILRE, cells were treated with H7 or H8 (50 μM) for 2 hours. The cells were washed and exposed to IL-1 or TNF for 24 hours. CAT activities were expressed as Fig. 3. Numbers above black bar (H7) and shaded bar (H8) indicate degrees of inhibition by H7 and H8 respectively (% inhibition). White bar denoted the CAT activity of none treatment with H7 or H8.

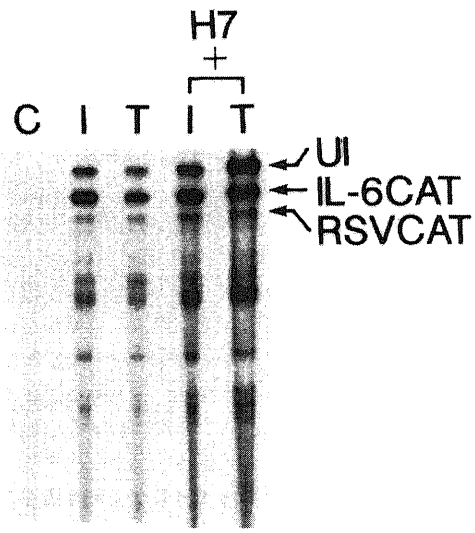

Fig. 7. Effect of protein kinase C inhibitor (H7) on the ILRE-dependent activation of the IL-6CAT gene by IL-1 and TNF. L cells were transfected with a mixture of IL-6CAT-59ILRE and pRSVCAT plasmids. Total RNA was prepared from unstimulated cells (C), or from cells stimulated for 2 hours with IL-1 (I) and TNF (T) in the presence or absence of 50 μM H7 and was subjected to RNase mapping analysis. IL-6CAT and UI refer to correctly initiated IL-6CAT transcripts and transcripts initiated an upstream IL-6 cryptic initiation site respectively: CAT transcripts derived from RSVCAT are also indicated.

(IB) の移動度が細胞質 (cytosol, C) で核 (nuclear extract, N) より少し速くなっているのは界面活性剤の影響であると考えられる．無刺激の状態では99%以上の ILRF は，細胞質に局在しているが IL-1 や TNF で刺激することによって，ILRF が核内に移行することによって ILRF の誘導が起こったと考えられる．また，IL-1/TNF の刺激による ILRF の核内への移行は，H7 によって顕著な阻害を受けなかった．

2．CAT アッセイ

IL-6CAT 59 ILRE を導入したL細胞を H7 あるいは H8 で2時間，前処理した後で IL-1 または TNF を加えて24時間培養した．細胞を回収し，細胞抽出液を調製し，CAT 活性を測定した (図6)．IL-1 のシグナルは，H7, H8 でともに約30%程度阻害された．一方，TNF のシグナルは，プロテインキナーゼAやCの阻害剤の影響をほとんど受けなかった．

3．リボヌクレアーゼ・マッピング

CAT アッセイにおけるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼの活性が，正常な転写開始点より合成された mRNA 量を反映しているか，確かめるためにリボヌクレアーゼ・マッピングを行った．

図7に示すようにIL-6CAT は，2時間の IL-1/TNF の刺激で著しく誘導された．また，この IL-1/TNF による IL-6CAT の転写誘導は，プロテインキナーゼ阻害剤 H7 によって阻害されなかった．

考　　察

IL-1 や TNF による IL-6 遺伝子の活性化において ILRE と呼ばれる IL-6 遺伝子プロモーター領域内のシス・エレメントが重要な働きをしていることは Shimizus らが示している[7]．ILRE は，NF-kB の結合モチーフと相同性が高い．また，ILRF は NF-kB 様因子でもある．本研究は，L細胞や HeLa 細胞のようなリンパ球以外の細胞において，IL-1/TNF による ILRF の核への移行やILRE を介した IL-6CAT の転写誘導には，プロテインキナーゼAやC以外のシグナル伝達経路が関与していることを示した．この結果は，Zhang らが報告した結果[14][24]と一致している．IL-1/TNF は細胞内の cAMP 量を上昇させるがH8や過剰な TPA 処理によってプロテインキナーゼAやCの経路を遮断した状態でも，線維芽細胞内在のIL-6遺伝子は誘導された．一方，Sehgal らは，細胞に内在する IL-6 遺伝子の IL-1/TNF による誘導は H7 によって有効に阻害されるという異なった結果を得ている[25]．今回，IL-1 による IL-6CAT の誘導活性は，H7 や H8 によって，30%程度の阻害がみとめられた (図6の IL-1)．IL-1 に関しては，プロテインキナーゼAやCの経路が二次的な役割をしてることが示唆された．TNF の誘導活性は，H7 や H8 の影響をほとんど受けなかった．このことから TNF の ILRE へのシグナルは，線維芽細胞において，プロテインキナーゼAやCとは異なるシグナル伝達経路が存在していることが示唆された (図6の TNF)．IL-1/TNF のシグナルにプロテインキナーゼCが関与するかどうかについては一致した見解が得られていない[14][15]．細胞質の ILRF の核内への移行が IL-1/TNF による IL-6 遺伝子の活性化に必要であるが，H7 や H8 処理によっても ILRF の核への移行を有効に阻害できなかった (図5)．NF-kB を誘導し[26]，IL-6 遺伝子を活性化する[27] poly I-C の刺激は，プロテインキナーゼCを活性化しないことが示されている[28]．これらの結果は，リンパ球以外の細胞において，IL-1/TNF のシグナル伝達経路としてプロテインキナーゼAやCは主要な経路ではないということを示している．

NF-kB は，前B細胞株70Z/3のようなリンパ系の細胞において TPA やフォルスコリンによって誘導される[9][12]．L細胞と HeLa 細胞を AP-1 が有効に誘導される実験条件で，TPA 処理しても IL-6ILRE や SV 40の DNA 配列に特異的に結合する NF-kB は，ゲル移動度シフトアッセイによって検出することができなかった (図4)．また，CAT アッセイでも同様の結果を得た (図3)．これに反し，Shirakawa らは，70Z/3を用いて，プロテインキナーゼAやCを活性化して NF-kB の核への移行が誘導できることを示した[13]．さらに，H8 処理によって NF-kB の核への移行が阻害できることを示した．彼らの結論として，70Z/3では，IL-1 のシグナルはプロテインキナーゼAやCを介して NF-kB に伝達されると考えている．これに対し，L細胞や HeLa 細胞で，ILRF の核への移行と CAT レポーター遺伝子の ILRE を介した転写活性に基づいて調べたところ，TPA やフォルスコリンのシグナルは，IL-1 の刺激に置き換えることが出来るほど強いものではなかった (図3)．H8 は，それらの細胞における IL-1 のシグナルを十分に遮断しなかった (図6)．加えて，Osborn らは，TPA の刺激に反応しない細胞株を用いて，TNF 処理によって NF-kB が誘導されることを示している[29]．この結果は，TNF の作用にはプロテインキナーゼCが関与していないことを示唆するものである．

IL-1 のシグナルにおける，これらの矛盾は IL-1 レセプターの多様性で説明できるかもしれない．IL-1 レセプターは，線維芽細胞やT細胞上の分子とB細胞上

の分子では抗原性や機能が異なることが報告されている[31)31)]．前B細胞上の IL-1 レセプターはプロテインキナーゼC依存の経路を介して IL-1 のシグナルを核に伝達する[32)]．一方，T細胞上の IL-1 レセプターは，プロテインキナーゼC以外の経路を介していることが示されている[33)]．しかしながら，すべての IL-1 シグナルに関する矛盾を IL-1 レセプターの多様性で説明することはできない．HeLa 細胞を用いて，Macchi ら[34)]や Kanno ら[35)]は著者らと一致した結論を導いているが，Sen ら[9)]や Nelsen ら[36)]は NF-kB に伝達されるシグナルはプロテインキナーゼCの経路が関与していると考えている．免疫グロブリンk鎖遺伝子エンハンサーである kB をプローブとして用いたゲル移動度シフトアッセイによって検出した NF-kB と，免疫グロブリンエンハンサーの kB エレメントを介した CAT レポーター遺伝子の発現は，いずれも HeLa 細胞を TPA で刺激することによって誘導された．一方，Chambon らのグループ[34)35)]は同じ HeLa 細胞を用いて，SV 40エンハンサー内の kB エレメントによって TPA は NF-kB を有意に誘導することはなかった．NF-kB 様転写因子の結合モチーフは，表1に示したように各遺伝子によって2，3の塩基ではあるが異なっており，コンセンサス配列はない．NF-kB 様転写因子には一群のタンパク質ファミリーがあってそのファミリーの中の異なる NF-kB 様転写因子が異なるシグナルに反応して各遺伝子の発現を活性化している可能性が考えられる．最近，NF-kB 遺伝子が同定された[37)38)]．NF-kB は，分子量約50,000のタンパク質 (p 50) と分子量約65,000のタンパク質 (p 65) から構成されているが，いずれのタンパク質もがん遺伝子の v-rel の遺伝子産物と相同性があることが示された．IL-1 のシグナルに関しては，研究グループ間で一致した見解が得られていないが，L細胞や HeLa 細胞を用いた今回の結果では，プロテインキナーゼCの経路を遮断した実験条件でも ILRF (NF-kB) は，IL-1/TNF によって誘導されることがわかった．これらの結果より，IL-1/TNF による ILRF の誘導にはプロテインキナーゼAやCは主要な経路ではないことが示唆された．

結　　論

IL-1/TNF のシグナル伝達経路を IL-6 遺伝子を用いて調べ，次の結論を得た．

1．線維芽細胞において，IL-1 や TNF のシグナルは TPA やフォルスコリンの刺激に置き換えることはできなかった．

2．IL-1/TNF によって核内に誘導される ILRF は，TPA やフォルスコリンの刺激には反応しなかった．

3．IL-1/TNF のシグナルはプロテインキナーゼ阻害剤の存在下でも，ILRF に伝達され，IL-6 遺伝子を活性化した．

4．リボヌクレアーゼ・マッピングによって，CAT アッセイの結果が，正常な転写開始点より合成された IL-6CAT mRNA の量を反映していることが確かめられた．

5．以上の結果より，線維芽細胞において，IL-1/TNF のシグナルはプロテインキナーゼAやC以外の経路を介して ILRF に伝達され，核内の ILRE によって IL-6 遺伝子を活性化していることが示された．

謝　　辞

稿を終わるに臨み，御指導，御校閲を賜った山本健一教授に心から謝意を表します．また，御教示を頂いた清水弘子助手ならびに御協力してくださった病態生理部各位に深く感謝いたします．

文　　献

1) **Oppenheim, J. J., Matsushima, K. & Durum, S. K.:** There is more than one interleukin-1. Immunol. Today, **7,** 45-56 (1986).

2) **Le, J. & Vilcek, J.:** Tumor necrosis factor and interleukin-1: cytokines with multiple overlapping biological activities. Lab. Invest., **56,** 234-248 (1987).

3) **Mantovani, A. & Dejana, E.:** Cytokines as communication signals between leukocytes and endotherial cells. Immunol. Today, **10,** 370-375 (1989).

4) **Beutler, B. & Cerami, A.:** The biology of cachectin/TNF: a primary mediator of the host response. Annu. Rev. Immunol., **7,** 625-655 (1989).

5) **Kishimoto, T.:** The biology of interleukin-6. Blood, **74,** 1-10 (1989).

6) **Le, J. & Vilcek, J.:** Interleukin-6: a maltifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. Lab. Invest., **61,** 588-602 (1989).

7) **Shimizu, H., Mitomo, K., Watanabe, T., Okamoto, S. & Yamamoto, K.:** Involvement of a NF-kB like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. Mol. Cell. Biol., **10,** 561-568 (1990).

8) **Sen, R. & Baltimore, D.:** Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell. **46**, 705-716 (1986).

9) **Sen, R. & Baltimore, D.:** Inducibility of k immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kB by a posttranslational mechanism. Cell, **47**, 921-928 (1986).

10) **Lenardo, M. J. & Baltimore, D.:** NF-kB: a pleiotropic mediator of inducible and tissue specific gene control. Cell, **58**, 227-229 (1989).

11) **Baeuerle, P. A. & Baltimore, D.:** IkB: a specific inhibitor of the NF-kB transcription factor. Science, **242**, 540-546 (1988).

12) **Shirakawa, F., Chedid, M., Suttles, J., Pollok, B. A. & Mizel, S. B.:** Interleukin-1 and cyclic AMP induce k immunoglobulin light-chain expression via activation of a NF-kB like DNA-binding protein. Mol. Cell. Biol., **9**, **959-964 (1989).**

13) **Shirakawa, F. & Mizel, S. B.:** In vitro activation and nuclear translocation of NF-kB catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. Mol. Cell. Biol., **9**, 2424-2430 (1989).

14) **Zhang, Y. J., Yip, Y. K. & Vilcek, J.:** Enhancement of cAMP levels and protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts: role in the induction of interleukin-6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 6802-6805 (1988).

15) **Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M. & Karin, M.:** Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor. Nature, **337**, 664-663 (1989).

16) **Lopata, M. A., Cleveland, D. W. & Sollner-Webb, B.:** High level transient expression of a chloramphenicol acetyltransferase gene by DEAE-dextran mediateed DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. Nucl. Acids. Res., **12**, 5707-5717 (1984).

17) **Gorman, C. M., Moffat, L. F. & Howard, B. H.:** Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltranferase in mammalin cell. Mol. Cell. Biol., **2**, 1044-1051 (1982).

18) **Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. & Roeder, R. G.:** Accurate transcreption initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res., **11**, 1475-1489 (1983).

19) **Sigh, H., Sen, R. & Baltimore, D.:** A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. Nature, **319**, 154-158 (1986).

20) **Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., Mac Donald, R. J. & Rutter, W. J.:** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, Biochemistry, **18**, 5294-5299 (1979).

21) **Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. & Green, M. R.:** Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucleic Acids Res., **12**, 7035-7056 (1984).

22) **Angel, P., Inagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. & Karin, M.:** Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. Cell, **49**, 729-739 (1987).

23) **Lee, W., Mitchell, P. & Tjian, R.:** Puriffed transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer element. Cell, **49**, 741-752 (1987).

24) **Zhang, Y., Lin, J. & Vilcek, J.:** Synthesis of interleikin-6 (interferon β 2/b cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. J. Biol. Chem., **263**, 6177-6182 (1988).

25) **Sehgal, P. B., Walther, Z. & Tamm, I.:** Rapid enhancement of β 2-interferon/B-Cell differentiation factor BSF-2 gene expression in human fibroblasts by diacylglycerol and the calcium ionophore A23187. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 3663-3667 (1987).

26) **Visvanathan, K. V. & Goodbourn, S.:** Double-stranded RNA activates binding of NF-kB to an inducible element in the human β-interferon promoter. EMBO J., **8**, 1129-1138 (1989).

27) **Content, J., Dewit, L., Poupart, P., Opdenakker, G., Van Damm J. & Billiau, A.:** Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leukocyte-derived factor. Eur. J. Biochem., **152**, 253-257

(1985).

28) **Hall, D. J., Jones S. D., Kaplan, D. R., Whitman, M., Rollins, B. & Stiles, C.:** Evidence for a novel signal transduction pathway activated by platelet-derived growth factor and by double-standed RNA. Mol. Cell. Biol., **9**, 1705-1713 (1989).

29) **Osborn, L., Kunkel, S. & Nable, G. J.:** Tumor necrosis factor and interleukin-1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kB. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 2336-2340 (1989).

30) **Bomsztyk, K., Sims, J. E., Stanton, T. H., Slack, J., McMahan, C. J., Valentine, M. A. & Dower, S. K.:** Evidence for different interleukin-1 receptors in murine B- and T-cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 8034-8038 (1989)

31) **Chizzonite, R., Truitt, T., Kilian, P. L., Stern, A. S., Nunes, P., Paker, K. P., Kaffka, I. L., Chua, A. O., Lugg, D. K. & Gubler, U.:** Two high affinity interleukin-1 receptors represent separate gene products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 8029-8033 (1989).

32) **Abradham, R. T., Ho, S. N., Barna, T. J. & Mckean, D. J.:** Transmembrans signaling during interleukin-1-dependent T cell activation. J. Biol. Chem., **262**, 2719-2728 (1987).

33) **Ostrowski, J., Meier, K. E., Stanton, T. H., Smith, L. L. & Bomsztyk, K.:** Interferon-γ and interleukin-1α induce transient translocation of protein kinase C activity to membranes in a B lymphoid cell line. J. Biol. Chem., **263**, 13786-13790 (1988).

34) **Macchi, M., Bornert, J. M., Davidson, J., Kanno, M., Rosales, R., Vigneron, M., Xiao, J. H., Fromental, C. & Chambon, P.:** The SV40 TC-II (kB) enhanson bind ubiquitous and cell type specifically inducible nuclear proteins from lymphoid and nonlymphoid cell lines. EMBO J., 8, 4215-4227 (1989).

35) **Kanno, M., Fromental, C., Staub, A., Ruflenach, F., Davidson, I. & Chambon, P.:** The SV40 TC-II (kB) and the related H-2k enhansons exhibit different cell type specific and inducible proto-enhancer activities, but the SV40 core sequence and the AP-2 binding site have no enhason properties. EMBO J., 8, 4205-4214 (1989).

36) **Nelsen, B., Hellman, L. & Sen, R.:** The NF-kB binding site mediates phorbol ester-inducible transcription in nonlymphoid cells. Mol. Cell. Biol., 8, 3526-3531 (1988).

37) **Kieran, M., Blank, V., Logeat, F., Vandekerckhove, J., Lottspeich, F., Le Bail, O., Urban, M. B., Kourilsky, P., Baeuerle, P. A. & Israel, A.:** The DNA binding subunit of NF-kB is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. Cell, **62**, 1007-1018 (1990).

38) **Ghosh, S., Gifford, A. M., Riviere, L. R., Tempst, P., Nolan, G. P. & Baltimore, D.:** Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kB: Homology to rel and dorsal. Cell, **62**, 1019-1029 (1990).

39) **Baldwin, A. S. & Sharp, P. A.:** Binding of a nuclear factor to a regulatory sequence in the promoter of the mouse H-2k class I major histocompatibility gene. Mol. Cell. Biol., **7**, 305-313 (1987).

40) **Bohnlein, E., Lowenthal, J. W., Siekevitz, M., Ballard, D. W., Franza, B. R. & Greene, W. C.:** The same inducible nuclear proteins regulates mitogen activation of both the interleukin-2 receptor-alpha gene and type 1 HIV. Cell, **53**, 827-836 (1988).

Activation of the Interleukin-6 Gene by Inflammatory Lymphokines: Evidence for Involvement of Protein Kinase A and C Independent Signal Transduction Pathways

Katsuyuki Mitomo, Department of Molecular Pathology, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920

— J. Juzen Med. Soc., **99,** 1144 — 1155 (1990)

Key words IL-1, IL-6, NF-KB, signal transduction, TNF

Abstract

It has been known that the activation of the Interleukin-6 (IL-6) gene by Interleukin-1 (IL-1) and Tumor Necrosis Factor (TNF) requires the presence of an IL-6 promoter cis-element, termed ILRE (Inflammatory Lymphokine Responsive Element). ILRE is homologus to binding motifs for a transcription factor, Nuclear Factor-kB (NF-kB) and binds an IL-1 / TNF inducible nuclear factor, termed ILRF (Inflammatory Lymphokine Regulatory Factor), which is similar if not identical to NF-kB. Both factors are present constitutively in the cytoplasm and translocate to the nucleus upon stimulation. The results presented in this paper indicate that the translocation of ILRF and subsequent activation of the IL-6 gene by IL-1 / TNF, mainly involves protein kinase A and C (PKC) independent intracellular signal transduction pathways. First, neither the PKA activators (forskolin) nor PKC activators (phorbol ester, TPA) efectively induced the translocation of ILRF and ILRE-dependent transcriptional activation, though TPA effectively activated the AP-1 (Activation Protein-1) factors and TRE (TPA Responsive Element)-dependent transcription under the same conditions. Second, none of the PKA and PKC inhibitors effectively blocked the translocation of ILRF and subsequent transcriptional activation of the IL-6 gene by IL-1 / TNF. Thus, these results indicate that IL-1 / TNF utilizes predominantly the PKA and PKC independent pathways in nonlymphoid cells, though the NF-kB system has been shown to be activated through the PKA and PKC pathways in pre-B cells. A possibility that IL-1 / TNF utilizes distinct intracellular signal transduction pathways in different types of cells for the activation of ILRF or related NF-kB transcription factors was discussed.