

論文概要

○ 論文題目

Glucocorticoids facilitate the transcription from the human cytomegalovirus major immediate early promoter in glucocorticoid receptor- and nuclear factor-I-like protein-dependent manner.

(グルココルチコイドはグルココルチコイド受容体と NF-I 様タンパク質依存的にヒトサイトメガロウイルス major immediate early プロモーターの転写を促進する)

○ 指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 吉川裕之教授

(所属) 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏名) 井上 真紀

【目的】

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は、胎児や臓器移植後の患者、AIDS 患者など、免疫抑制または不全状態にある患者において、潜伏感染から増殖感染へ移行 (再活性化) することで重篤な症状を引き起こす。胎内感染では母体が妊娠初期に初感染することが主な原因とされているが、近年では再活性化による感染も否定できないとされている。産科臨床においては、HCMV は妊娠第 1・2 三半期よりも第 3 三半期に、再活性化により検出率が増加することが報告されてきたが、その機構はほとんど明らかでない。

HCMV の major immediate early (MIE) 遺伝子産物は増殖感染におけるウイルス遺伝子発現の段階的な進行に重要であり、潜伏感染時にはその発現が抑制される。このように、MIE 遺伝子は HCMV 生活環の制御に重要であり、MIE 遺伝子の転写は多くの組織特異的・刺激応答性の転写因子によって制御されている。

グルココルチコイドはグルココルチコイド受容体 (GR) を介した転写制御により、抗炎症作用など多彩な作用を生体にもたらす。興味深いことに、妊娠第三半期には血中ハイドロコルチコイド濃度が上昇することが報告されている。また、HCMV 再活性化のトリガーの一つとして、血中ハイドロコルチコイド濃度の上昇を示唆する報告もあるが、詳細は明らかでない。そこで本研究では、HCMV 再活性化とグルココルチコイドの関連性を解明することを目的とし、グルココルチコイドによる HCMV の MIE 遺伝子発現制御機構について解析を行った。

【対象と方法】

ヒト上皮線維芽細胞 (BJ-TERT 細胞) に HCMV AD169 株を感染後、合成グルココルチコイドであるデキサメサゾン (DEX) 処理を行い、定量 RT-PCR により MIE 遺伝子の転写量を解析した。MIE 遺伝子の転写制御領域をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポータープラスミド pMIEP-Luc を作製して HeLa 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイおよび定量 RT-PCR により DEX の転写への影響を解析した。また pMIEP-Luc の欠損変異体を用いて、DEX 依存的な転写活性化に関わる領域を同定した。また GR のアンタゴニストである RU486 を用いて、MIE 転写促進における GR の依存性を検討した。DEX 応答性の転写調節領域に結合する因子について、ゲルシフトアッセイ (EMSA) により解析した。DEX 応答性領域に結合する因子の依存性について、この領域に点変異を導入したレポータープラスミドを作製して検証した。

【結果】

HCMV 感染細胞における MIE 遺伝子の mRNA 量は、DEX 処理により約 2 倍に増加

した。また pMIEP-Luc を用いたルシフェラーゼアッセイより、DEX 存在下でルシフェラーゼ活性および mRNA 量の上昇が観察された。以上の結果より、DEX は MIE 遺伝子の発現を転写レベルで促進することが明らかとなった。

pMIEP-Luc 欠損変異体を用いたルシフェラーゼアッセイにより、MIE 遺伝子転写開始点から上流約 200 bp にある 17 塩基反復配列を含む領域が DEX による転写促進に重要であることが分かった。また 17 塩基反復配列を持つレポーターからの DEX 依存的な転写促進は、RU486 の添加により抑制された。以上の結果より、17 塩基反復配列を含む領域が、GR および DEX 依存的な MIE 遺伝子の転写促進に関与することが示された。

EMSA による解析から、DEX 応答性の 17 塩基反復配列に結合する因子が Nuclear factor-I (NF-I) 様の性質を持つことが示唆された。しかし、DEX 処理によりこの 17 塩基反復配列と NF-I 様タンパク質複合体が質的・量的に変化する様子は観察されなかった。DEX 応答性の 17 塩基反復配列内に、NF-I 様タンパク質が結合できない変異を導入したところ、DEX 存在下で転写促進が観察されなくなった。以上の結果より、NF-I 様タンパク質は 17 塩基反復配列を通して DEX 依存的な MIE 遺伝子の転写促進に関与することが示された。

【考察】

DEX 存在下において、HCMV MIE 遺伝子の転写が、GR および NF-I 様因子依存的に促進されることが明らかとなった。おそらく細胞内では、DEX に結合した GR が HCMV ゲノムの MIE 転写調節領域に結合し、これがウイルスゲノム DNA の構造変化を引き起こす事で NF-I 様因子の結合を促進するのではないかと考えられる。しかし、本研究では、このような GR と NF-I 様因子の共役機構までは明らかに出来なかった。今後は GR の結合領域の同定と、GR と NF-I 様因子の共役機構を検証する必要がある。

最近、グルココルチコイドが HCMV の再活性化を促進することで、臓器移植後の HCMV 関連合併症率を増加させ得ることが報告された。我々の結果は、グルココルチコイド代謝が HCMV 生活環とそれに関連した疾患に関与することを強く裏付けるものと考えている。今後は、胎内感染における GR および NF-I の機能に着目することで、妊娠第三半期における血中ハイドロコルチコイド濃度の上昇と HCMV 再活性化の関連性の解明に迫れる可能性があり、産科臨床の発展にも貢献できると考えている。

【結論】

グルココルチコイドが、GR と NF-I 様タンパク質依存的に HCMV MIE 遺伝子の転写を促進することにより、ウイルスの再活性化に寄与している可能性が示唆された。