

論文の内容の要旨

氏名：佐田 英理

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Usefulness of recombinant His-ppIL- α and its specific Ab for the analysis of ppIL- α function
(ppIL- α の機能解析における His-ppIL- α とその特異的抗体の有用性)

Alarmin とは障害を受けた細胞が、周囲の細胞に自身の置かれた危機的状況を周知し、破壊された組織の再生を促進することにより、生体の恒常性維持に寄与する物質の総称である。IL- 1α は alarmin の一種であり、細胞質内で 34kDa の前駆体 (precursor IL- 1α : pIL- 1α) として産生される。pIL- 1α は細胞質内でカルパインなどの酵素により N 末端側の propeptide IL- 1α (ppIL- 1α) と C 末端側の成熟型 IL- 1α (mature IL- 1α) に切断される。pIL- 1α と ppIL- 1α は nuclear localizing signals (NLS) を有しており、核内に局在し、転写調節などに関与していることなどが報告されているが、ppIL- 1α を認識する特異的抗体 (Ab) が存在しないため、その機能については不明な点が多い。

そこで本研究では、ppIL- 1α の機能解析を目的として ppIL- 1α に対する特異的 Ab の作製を試みた。発現ベクター pTrc-His vector に ppIL- 1α を挿入し、大腸菌 BL21 株に transform した。大腸菌を 37°C で 18 時間培養後、1 mM IPTG を添加しさらに 18 時間培養した。この操作により発現誘導された N 末端にヒスチジンタグを付加した組換え ppIL- 1α タンパク質 (His-ppIL- 1α) を精製した。精製にはニッケルレジンを用い、大腸菌からの His-ppIL- 1α の回収は 8 M 尿素溶液 (100 mM sodium dihydrogen phosphate, 10 mM Tris-HCl [pH 6.3]) を用いた。精製した His-ppIL- 1α 0.2-0.4 mg をウサギに免疫 (2 週間毎に 5 回皮下射) することにより、ppIL- 1α に対する抗血清を得た。さらに、protein A column を用いて affinity 精製を行った。また、sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) システムの確立を目的として、得られた特異抗体をビオチン化した。すなわち、抗体を 1 mg/ml の N-hydroxysuccinimide-biotin (NHS-biotin) 溶液で室温にて 4 時間反応させビオチン化反応を行った。ビオチン化後の抗体は、PBS で透析し、ELISA に用いた。

始めに Ab の反応性及び特異性を Western blotting で確認した。ヒト子宮頸がん由来細胞 (HeLa) に green fluorescence protein (GFP) および GFP-ppIL- 1α の発現ベクター (pEGFP および pEGFP-ppIL- 1α) を transfection し、transfectant の細胞溶解液を 15% SDS-PAGE に展開した。細胞溶解液は Triton X-100 溶液 (1% triton X-100/ 10 mM Tris-HCl buffer [pH 8.0]) を用いて調整した。通法に従ってナイロン膜に転写後、抗 GFP 抗体により Western blotting を行った。その結果、GFP および GFP-ppIL- 1α の両者がそれぞれ 27 および 43 kDa のバンドとして検出された。抗 ppIL- 1α 抗体による Western blotting では、GFP-ppIL- 1α のみが検出された。この結果は、本抗体が ppIL- 1α を特異的に検出することを示唆するものであった。次に、段階的に希釈した His-ppIL- 1α を用いて sandwich ELISA による検量線を作成したところ、濃度依存的に吸光度が減少し、検出限界は 1.15 ng (3 μ g/ml) であった。これを用いて、GFP-および GFP-ppIL- 1α transfectant の細胞溶解液中の ppIL- 1α の量を測定した。その結果、 $1 \times 10^5/24$ well の HeLa 細胞に対する transfection により、GFP-ppIL- 1α transfectant は 19.2 ng/ml の ppIL- 1α を含んでいることが判明した。

NLS の存在により ppIL- 1α は主に核内に存在すると想定されるが、このことについて pcDNA および pcDNA-ppIL- 1α transfectant を用いて検討した。その結果、pcDNA-ppIL- 1α transfectant では核内に極めて強い蛍光が検出され、この蛍光は、核を染色する 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) と overlap する像を呈した。これに対し、pcDNA transfectant では強い蛍光は全く検出できなかった。

以上、His-ppIL- 1α を免疫原として ppIL- 1α を特異的に認識する抗体を得、さらにこの抗体をビオチン化することにより、ppIL- 1α を検出する sandwich ELISA system を構築することができた。また、pcDNA-ppIL- 1α transfectant の蛍光免疫染色の結果、ppIL- 1α が細胞内では主に核内に局在することが確認できた。IL- 1α は代表的な alarmin であるが、ppIL- 1α も同様に alarmin として機能するか否かについては明らかな報告がない。alarmin は細胞外に放出されることにより、周囲の細胞に対してその機能を発揮する。ppIL- 1α が alarmin として機能するのであれば、細胞外における ppIL- 1α の機能解析が不可

欠である。本研究において確立した sandwich ELISA system および His-ppIL-1 α は、ppIL-1 α の機能解明に対して極めて重要な材料となることは疑いの余地がない。

歯科矯正治療に際して、歯周組織に細胞障害作用が及ぶことは周知の事実である。この際、歯根膜中に存在する線維芽細胞や骨芽細胞から alarmin 分子が放出されることが予想され、臨床症状や予後に大きく関与することが考えられる。本研究により確立された sandwich ELISA system は歯根膜中に放出される ppIL-1 α の定量を可能とし、また、抗体作製に際して得られた His-ppIL-1 α は、in vitro 研究を通じて ppIL-1 α の機能解析に道を開くものであり、極めて有用であると考えられた。