

## 論文の内容の要旨

氏名：篠崎 泰久

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Recombinant mouse allograft inflammatory factor-1 の生物学的活性

Allograft inflammatory factor (AIF) -1 は、慢性拒絶反応が続くラットの異所性心移植モデルにおいて、冠動脈周囲に浸潤したマクロファージに発現するタンパク質として同定された。147 アミノ酸よりなる分子量約 17 kDa のタンパク質であり、Interferon (IFN)  $\gamma$  の刺激により産生増強されるが、リンパ球や線維芽細胞、脂肪細胞などからも産生されることが確認されている。AIF-1 はその後同定された ionized calcium-binding adaptor protein (Iba) -1 と同じ分子であることが明らかにされ、マウスでは精巣に高度、脾臓やリンパ節、肝臓、胸腺などに軽度から中等度の発現が認められる。また、AIF-1 には様々な splicing variants が存在し、Ca 結合に関与する EF-hand と類似した立体構造を有しており、その構造的特徴によって細胞増殖や遊走、炎症細胞の活性化、動脈硬化、線維化などに関与するとされている。しかし、AIF-1 発現および調節の機序等については未だ不明な点が多い。本研究では、遺伝子組換え技術を用いて recombinant マウス AIF-1 (rAIF-1) を作製し、得られた rAIF-1 の生物学的活性の有無について検討することを目的とした。

マウスのマクロファージ系培養細胞株である RAW264.7 細胞から total RNA を抽出し、complementary DNA を作成した後、polymerase chain reaction (PCR) により AIF-1 の full length cDNA を増幅した。得られた増幅産物を TA cloning により *lacIq* promoter と Histidine (His) Tag を有する pTrc-His-TOPO ベクターに挿入し、発現ベクターを構築した。このベクターを大腸菌 DH5  $\alpha$  に transformation し、得られた plasmid の DNA シークエンス解析を行い、塩基配列を確認した。シークエンスの確認後、タンパク質発現用の大腸菌である BL21 に transformation した。得られた大腸菌を LB 培地で 37°C、18 時間振盪培養した後、1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) の存在下または非存在下に培養し、抽出液を調整した。rAIF-1 の精製は、抽出液と反応させた Ni<sup>2+</sup>-NTA-アガロースビーズを urea buffer で 5 回洗浄した後、elution buffer (500 mM imidazole in urea buffer) により抽出した。続いて、産生されたタンパクが rAIF-1 であることを確認するため、Western blot を行った。Western blot は、通常に従いナイロン膜に泳動タンパクを transfer した後に 1% BSA-PBST (0.2% Tween-20/PBS) によりブロッキングを行った。1 次抗体として、ウサギ抗マウス Iba-1 モノクローナル抗体またはマウス抗 His モノクローナル抗体を 1% BSA-PBST で 1,000 倍に希釈したものをを用いた。2 次抗体は horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体または HRP 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 抗体を 1% BSA-PBST で 10,000 倍希釈したものをを用いた。バンドは ECL kit を用いて検出した。rAIF-1 の生物学的活性の判定にはマウスミクログリア由来の細胞株である MG 6 を用いた。細胞の培養は 10% ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's minimum essential medium にペニシリン・ストレプトマイシンを加えたものをを用いた。MG 6 を rAIF-1 (10 ng/ml) で刺激し、total RNA を精製し real-time PCR により AIF-1 および interleukin (IL) -6 mRNA の発現について検討した。AIF-1 産生量の変化は ELISA により測定した。

本研究の結果、AIF-1 発現 plasmid を transform した大腸菌 BL21 を用いた検索では、rAIF-1 は IPTG により発現誘導されることがわかった。rAIF-1 は、17 kDa の位置に単一バンドとして Coomassie Brilliant Blue 染色により検出された。このことから、N 末端側に付加した histidine-tag を用いたタンパク質精製により、精製度の高い rAIF-1 の作製が出来たと考えられた。得られた rAIF-1 を段階的に希釈し、Western blot を行ったところ、抗 Iba-1 抗体による検出限界は約 60 pg であることが解った。また、抗 His 抗体を用いた Western blot の結果、17 kDa の位置にバンドが検出された。以上の結果から、今回精製したタンパク質は、抗 Iba-1 抗体および抗 His 抗体に反応する His-tag rAIF-1 であることが確認できた。得られた rAIF-1 によって MG 6 を刺激したところ、刺激後 1 時間で AIF-1 および IL-6 mRNA の発現が増強された。AIF-1 の発現誘導を ELISA によりタンパク質レベルで確認したところ、rAIF-1 刺激によりコントロール (6.2  $\pm$  0.2 pg/ml) と比較して刺激群において有意に (16.1  $\pm$  5.1 pg/ml) AIF-1 産生が増強されていることが明らかとなった。AIF-1 による IL-6 誘導についてはこれまでにマクロ

マクロファージ系細胞である RAW264.7 において報告が見られるが、AIF-1 自体の発現誘導についての報告はない。AIF-1 がオートクラインにより AIF-1 mRNA 発現を増強するという新たな発見は、AIF-1 の標的となる細胞の機能的系統の解析に MG6 が有用である可能性を示唆するものであった。

AIF-1 は様々な病態において血中濃度が上昇することが知られている。しかし、この現象が生体に対してどのような意味を有するのかについては十分に解明されていない。AIF-1 の機能は前述の通り多彩であるが、AIF-1 の受容体は未だにクローニングされておらず、従ってそのシグナル伝達経路についても不明な点が多い。本研究で作製された rAIF-1 は、その受容体の同定や AIF-1 の細胞外機能の追及などに有用であると考えられた。