

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主査） 教授 川戸 貴行

（副査） 教授 外木 守雄 教授 浅野 正岳

教授 武市 収

Allograft inflammatory factor (AIF) -1 は、慢性拒絶反応が続くラットの移植心に集積するマクロファージにおいて同定された 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- γ 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、マウスでは精巢に高度、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。このように AIF-1 の機能は多彩であるが、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、その発現およびシグナル伝達経路についても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、その生物学的活性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 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 pTrec-His-TOPO ベクターに挿入し、発現ベクターを構築した。この発現ベクターを大腸菌に transformation 後、isopropyl- β -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。抽出液を Ni²⁺-NTA-アガロースビーズと反応させた後に urea buffer で洗浄し、500 mM imidazole を含む elution buffer で溶出し、N 末端側に His tag が付加された rAIF-1 の精製度を高めた。産生されたタンパク質が rAIF-1 であることは抗 Iba-1 抗体を用いた Western blot によって確認を行った。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。MG 6 を rAIF-1 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 タンパク発現量の変化は ELISA により測定した。

その結果、以下の結論を得た。

1. rAIF-1 発現は IPTG 存在下で明瞭に発現増強され、17 kDa の位置に泳動されることが明らかとなった。
2. rAIF-1 は、抗 Iba-1 抗体および抗 His 抗体に反応したことから、His-tag rAIF-1 であることが確認できた。
3. 得られた rAIF-1 で MG 6 を刺激したところ、AIF-1 および IL-6 mRNA の発現増強が認められた。
4. rAIF-1 刺激による AIF-1 の発現増強はタンパク質レベルでも確認された。

以上のことから、本研究で作製された rAIF-1 は生物学的活性を有しており、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。

これらの知見は、病態病理学やその関連分野の発展に寄与するところ大であると考えられた。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

令和3年3月10日