

Recombinant mouse allograft inflammatory factor-1 の生物学的活性

篠崎 泰久

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

(指導：外木 守雄 教授，浅野 正岳 教授，篠塚 啓二 助教)

## 研究要旨

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 17kDa タンパク質であり、interferon- $\gamma$  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、その生物学的活性について検討した。今回、rAIF-1 の精製度を上げるために、N 末端側に Histidine (His) tag を付加したタンパク質として精製した。その結果、得られた 17kDa のバンドは、isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside により発現が増強されること、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。作製された rAIF-1 をマウスミクログリア細胞である MG6 に

作用させ、AIF-1 および interleukin-6 の mRNA 発現について real-time PCR により検討した。その結果、rAIF-1 作用 1 時間後に両分子の mRNA 発現が増強された。そこで AIF-1 の発現変化をタンパクレベルで確認するために enzyme-linked immunosorbent assay により検討したところ、rAIF-1 刺激により rAIF-1 を作用させないコントロールと比較して有意に AIF-1 分泌が増強された。

以上のように、本研究で作製された rAIF-1 は、生物学的活性を有することが示唆され、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。

## 緒言

Allograft inflammatory factor (AIF) -1 は、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発見された。147 アミノ酸よりなる約 17 kDa のポリペプチドで、Ca<sup>2+</sup>-binding EF-hand を有している<sup>1)</sup>。Interferon- $\gamma$  などによって発現制御される<sup>2)</sup>が、マクロファージ以外にも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<sup>3)</sup>。マウスでは、精巣や脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺などでも発現が認められ<sup>4)</sup>、哺乳類間で高い相同性を示す<sup>5,6)</sup>。その後の研究で、ionized-calcium binding adapter protein (Iba) -1<sup>7)</sup> や microglia response factor-1<sup>8)</sup> などがクローニングされ、これらは AIF-1 と同じ分子であることが明らかとなり、その他の類縁タンパク質と共に現在では AIF-1 family と呼ばれる分子群を構成している<sup>9)</sup>。AIF-1 は、細胞増殖や細胞遊走、サイトカイン、ケモカインの分泌、動脈硬化、内分泌系、線維化などへの関与が報告されている<sup>1)</sup>が、その本質的な機能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、そ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。

## 材料および方法

### 1. 発現ベクターの構築と大腸菌への transformation

AIF-1 の full length cDNA は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) にて増幅した。使用したプライマーを表 1 に示す。得られた増幅産物を pTrc-His-TOPO TA Expression Kits (Invitrogen) を用いて, 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, 大腸菌 DH5 $\alpha$  (TaKaRa) に transformation した (図 1)。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後, タンパク質発現用の大腸菌である BL21 (TaKaRa) に transformation した。

### 2. rAIF-1 の発現誘導と精製

得られた transformation 後の大腸菌を LB 培地で 37°C, 18 時間振盪培養した後, 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を作用させ, さらに 18 時間発現誘導した。培養後, 大腸菌を回収し (10,000  $\times$  g, 5 分), 上清を捨てた後, urea buffer (8 M Urea, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 6.3) に溶解した。溶解液を 30 秒間, 5 回, 氷上で sonication した後, 4°C で 10,000  $\times$  g, 5 分間遠心し, 上清を 15 ml チューブに回収した。これに, Ni<sup>2+</sup>-NTA-アガロースビーズ (QIAGEN) を添加し, 4°C で 18 時間ビーズと溶解液を混合した。反応液を遠心して, ビーズを回収し, urea buffer で 4°C にて 5 回洗浄した。洗浄後, ビーズの一部を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

(ゲル濃度 15%) に供した。泳動後のゲルを通常に従い、Coomassie Brilliant Blue (CBB) で染色し、rAIF-1 の存在を確認した。rAIF-1 の精製は、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。抽出液中の rAIF-1 濃度は protein assay kit (Bio-Rad) により測定した。

### 3. Western blot 法

得られた rAIF-1 を段階的に希釈し、SDS -PAGE (ゲル濃度 15%) に供した。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 次抗体は、ウサギ抗マウス Iba-1 モノクローナル抗体 (Abcam; ab178846) またはマウス抗 His モノクローナル抗体 (MBL) 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 (Abcam) 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 (GE Healthcare) を用いて検出した。

### 4. MG6 の培養と rAIF-1 による刺激

rAIF-1 の生物学的活性の評価にはマウスミクログリア由来細胞株 MG 6<sup>10,11)</sup> 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。培養プレート (24-well) に細胞を 1 x 10<sup>5</sup>/well で播種し、rAIF-1 (10 ng/ml に調整) で刺激した。また、未刺激での培養をコ

ントロールとした。Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) に用いた上清サンプルは、rAIF-1 での刺激 1 時間後に rAFI-1 を含まない培地に交換し、さらに 18 時間培養したものをを用いた。

## 5. Real-time polymerase chain reaction (PCR)

細胞を刺激し、1 時間後に total RNA を RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて抽出し、Superscript III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて cDNA を作成した。PCR は TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus, TaKaRa) を用いて行い、Thermal Cycler Dice® Real Time System TP800 (TaKaRa) により解析した。House keeping 遺伝子として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。Real-time PCR に用いた primer は TaKaRa より購入した。

## 6. ELISA による AIF-1 の定量

rAIF-1 で MG 6 を刺激し、18 時間後に培養上清を回収した。回収した培養上清を遠心機で  $12,000 \times g$ , 3 分間遠心しサンプルとした。AIF-1 の定量は ELISA kit (MyBioSource) を用いて製造社指示に従い、行った。

## 7. 統計学的解析

rAIF-1 刺激による AIF-1 および IL-6 mRNA の発現変化、また、AIF-1 タンパク質レベルでの産生変化に関する統計学的解析は等分散検定の Paired *t*-test を用いて有意差検定を

行った。なお,  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結果

### 1. IPTG による rAIF-1 発現増強

Transformation により得られた大腸菌 BL21 を 1 mM IPTG 存在下または非存在下に培養し, rAIF-1 の誘導の有無について検討した。Ni<sup>2+</sup>-NTA-アガロースビーズに吸着させた rAIF-1 を電気泳動し, CBB 染色により確認を行った。その結果, 図 2 に示した通り, rAIF-1 は IPTG 存在下で明瞭に発現増強され, 17 kDa の位置に泳動された。

### 2. Western blot における rAIF-1 の確認

IPTG で発現誘導されたタンパクが rAIF-1 であることを Western blot により確認した。得られた rAIF-1 を段階的に希釈し, Western blot を行ったところ, 用いた抗 Iba-1 抗体と反応したバンドは, CBB 染色で確認されたバンドと同じ 17 kDa の位置に認められ, 検出限界は約 60 pg であった (図 3, 上段)。また, 作製した rAIF-1 は N 末端に histidine-tag を付加していることから, 抗 His 抗体を用いて同様に Western blot を行った。その結果, 抗 Iba-1 抗体と同様に 17 kDa の位置にバンドが検出された (図 3, 下段)。

### 3. rAIF-1 の生物学的活性の判定



得られた rAIF-1 の生物学的活性を判定するために MG 6 を rAIF-1 によって刺激し、AIF-1 および IL-6 mRNA の発現変化について検討した。その結果、刺激 1 時間後に、AIF-1 はコントロールに比較して 1.49 倍、IL-6 は 1.62 倍に発現が増強された (図 4)。

rAIF-1 刺激による AIF-1 mRNA 発現増強をタンパク質レベルで確認した。刺激 18 時間後の培養上清中の AIF-1 タンパクを ELISA により測定したところ、コントロールでは  $6.2 \pm 0.2$  pg/ml であったのに対し、刺激群では  $16.1 \pm 5.1$  pg/ml に発現が上昇した (図 5)。

## 考察

今回の実験では、大腸菌を用いて rAIF-1 の精製を行った。実験的に、タンパク質の精製を行った場合、市販の recombinant タンパク質とは異なり、濃度や量が不安定になりやすい。また、他のタンパク質の混入 (contamination) や、精製過程で混入する共存物質によって正確な定量分析が困難となるなどの問題がある<sup>12)</sup>。そこで、今回は、rAIF-1 の精製度を上げるために、N 末端側に His-tag を付加したタンパク質として精製することにした。His-tag は、6~10 残基の His からなり、タグ部分の分子量が小さいために目的タンパク質の活性や構造への影響が少ないうえ、Ni イオンに対して高いアフィニティーを有する<sup>13)</sup>。さらに精製方法がほぼ確立されていることから、組換えタンパク質の精製と検出に広く用いられている方法である。本研究では、Ni-NAT アガロースゲルと結合したタンパクは、CBB で染色される SDS-PAGE 像で 17 kDa の位置に泳動され、さらにこのタンパクバンドは IPTG 添加で発現の増加が確認された。本研究で用いた plasmid ベクターは、クローニングサイトの前に *lacIq* プロモーターを有する (図 1) ことから、IPTG で発現が増加したタンパクは rAIF-1 である可能性が考えられた。次に、AIF-1 と同じ分子であることが報告されている Iba-1 に対する抗体または His タグに対する抗体で Western blot を行った結果、17 kDa のタンパクはこれらの抗体と反応したことから、His-rAIF-1 であることが確認された。

次に、得られた rAIF-1 の生物学的活性を検証するために、マウスミクログリア由来細胞 MG 6 を rAIF-1 により刺激したところ、AIF-1 および IL-6 mRNA の発現が増強された。これまで、AIF-1 がマクロファージ系細胞である RAW264.1 細胞において IL-6 発現

を誘導することが報告されているが<sup>14)</sup>、AIF-1 自体の発現誘導を示した報告は見当たらない。この結果を確認するために ELISA により AIF-1 分泌量を確認したところ rAIF-1 刺激群において AIF-1 産生が増強されていることが明らかとなった。このことは、AIF-1 産生細胞であるミクログリアに対して、AIF-1 が作用し、オートクラインにより AIF-1 自体の発現を誘導する可能性を示唆したものであり、その分子メカニズムの詳細は今後さらに検討する必要がある。また、前述の RAW264.7 細胞は MG6 とともにマクロファージ系細胞ではあるが、近年マクロファージやミクログリアにも機能的な違いから数種類の細胞系統があることが示されている<sup>15)</sup>。本研究の結果は、AIF-1 の標的となるミクログリアがどの系統に属する細胞であるかを確認する一助になりうると考える。

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<sup>4)</sup>。しかし、AIF-1 の血中濃度の上昇が生体にとっ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、生物学的機能を発揮しうるものであったことに加え、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。

## 結論

本研究では、遺伝子組換え技術を用いて rAIF-1 をより高精度に精製するために、N 末端側に His tag を付加したタンパク質として作製し、その生物学的活性について検討した。その結果、以下の結論を得た。

1. rAIF-1 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 でマウスミクログリア由来細胞株 MG6 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。

以上より、得られた 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。

## 謝辞

本研究遂行にあたり，格別なるご指導を賜りました日本大学歯学部口腔外科学第 I 講座の外木守雄教授に心より感謝申し上げます。本研究をご指導およびご校閲賜りました日本大学歯学部病理学講座の浅野正岳教授に謹んで深く感謝申し上げます。最後に本研究を通じ多大なるご協力とご助言を賜りました，日本大学歯学部口腔外科学第 I 講座の篠塚啓二助教を始め，日本大学歯学部口腔外科学第 I 講座また日本大学歯学部病理学講座の皆様には感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME (1995) Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest* 95, 2954-2962.
- 2) Sibinga NE, Feinberg MW, Yang H, Werner F, Jain MK (2002) Macrophage-restricted and interferon gamma-inducible expression of the allograft inflammatory factor-1 gene requires Pu.1. *J Biol Chem* 277, 16202-16210.
- 3) Zhao YY, Yan DJ, Chen ZW (2013) Role of AIF-1 in the regulation of inflammatory activation and diverse disease processes. *Cell Immunol* 284, 75-83.
- 4) 山本相浩, 川人豊 (2014) Allograft inflammatory factor-1 の免疫学的機能および役割について. *日本臨床免疫学会会誌* 37, 139-145.
- 5) Mentschel J, Deininger MH, Schluesener HJ, Claus R (2002) Effects of malnutrition on the expression of daintain/AIF-1 in the gut mucosa of pigs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49, 184-188.
- 6) Deininger MH, Seid K, Engel S, Meyermann R, Schluesener HJ (2000) Allograft inflammatory factor-1 defines a distinct subset of infiltrating macrophages/microglial cells in rat and human gliomas. *Acta Neuropathol* 100, 673-680.
- 7) Imai Y, Iyata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S (1996) A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 855-862.

- 8) Tanaka S, Suzuki K, Watanabe M, Matsuda A, Tone S, Koike T (1998) Upregulation of a new microglial gene, mrf-1, in response to programmed neuronal cell death and degeneration. *J Neurosci* 18, 6358-6369.
- 9) Deininger MH, Meyermann R, Schluesener HJ (2002) The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett* 514, 115-121.
- 10) Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I (2006) Suppressive effect of simvastatin on interferon-beta-induced expression of CC chemokine ligand 5 in microglia. *Neurosci Lett* 407, 205-210.
- 11) Takenouchi T, Ogihara K, Sato M, Kitani H (2005) Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca<sup>2+</sup> influx and pore formation induced by the activation of P2X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line. *Biochim Biophys Acta* 1726, 177-186.
- 12) 鈴木祥夫 (2018) タンパク質と核酸・遺伝子をはかる 総タンパク質の定量法. *ぶんせき* 517, 2-9.
- 13) 相沢智康 (2008) Ni-NTA アフィニティーカラム. *蛋白質科学会アーカイブ* 1, e019.
- 14) Watano K, Iwabuchi K, Fujii S, Ishimori N, Mitsuhashi S, Ato M, Kitabatake A, Onoé K (2001) Allograft inflammatory factor-1 augments production of interleukin-6, -10 and -12 by a mouse macrophage line. *Immunology* 104, 307-316.
- 15) Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.

表1 mouse AIF-1 プライマー

	塩基配列
mouse AIF-1 forward	5'- ATGACGATAAGGATCCCATGAGCCAAAGCAGGG-3'
mouse AIF-1 reverse	5'- CAAAACAGCCAAGCTTCAGGGCAGCTCGGAGAT-3'



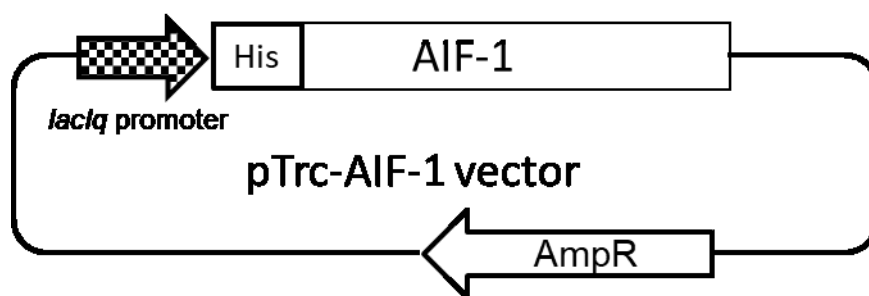


図 1 : 発現ベクターの構築

Full length AIF-1 の open reading frame を大腸菌発現ベクターである pTrc-His vector に subcloning した。

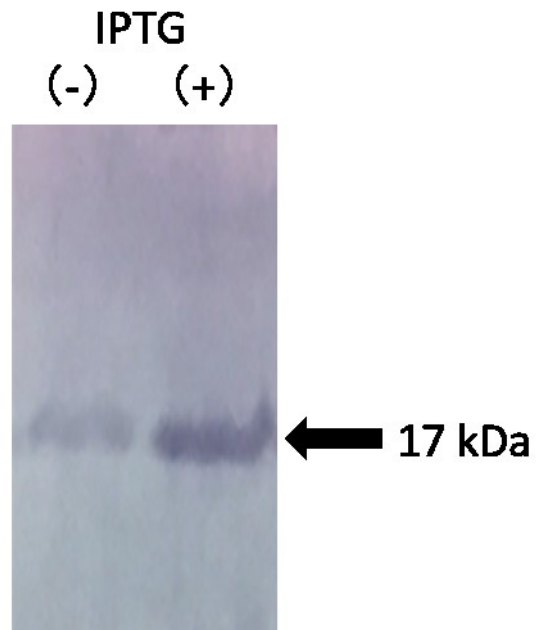


図 2 : CBB 染色による rAIF-1 の発現確認

1 mM IPTG の存在下または非存在下で 18 時間発現誘導させた後、大腸菌を urea buffer に溶解した。溶解液を  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-アガロースビーズに吸着させ、洗浄、SDS-PAGE (ゲル濃度 15%) 後、CBB 染色した。

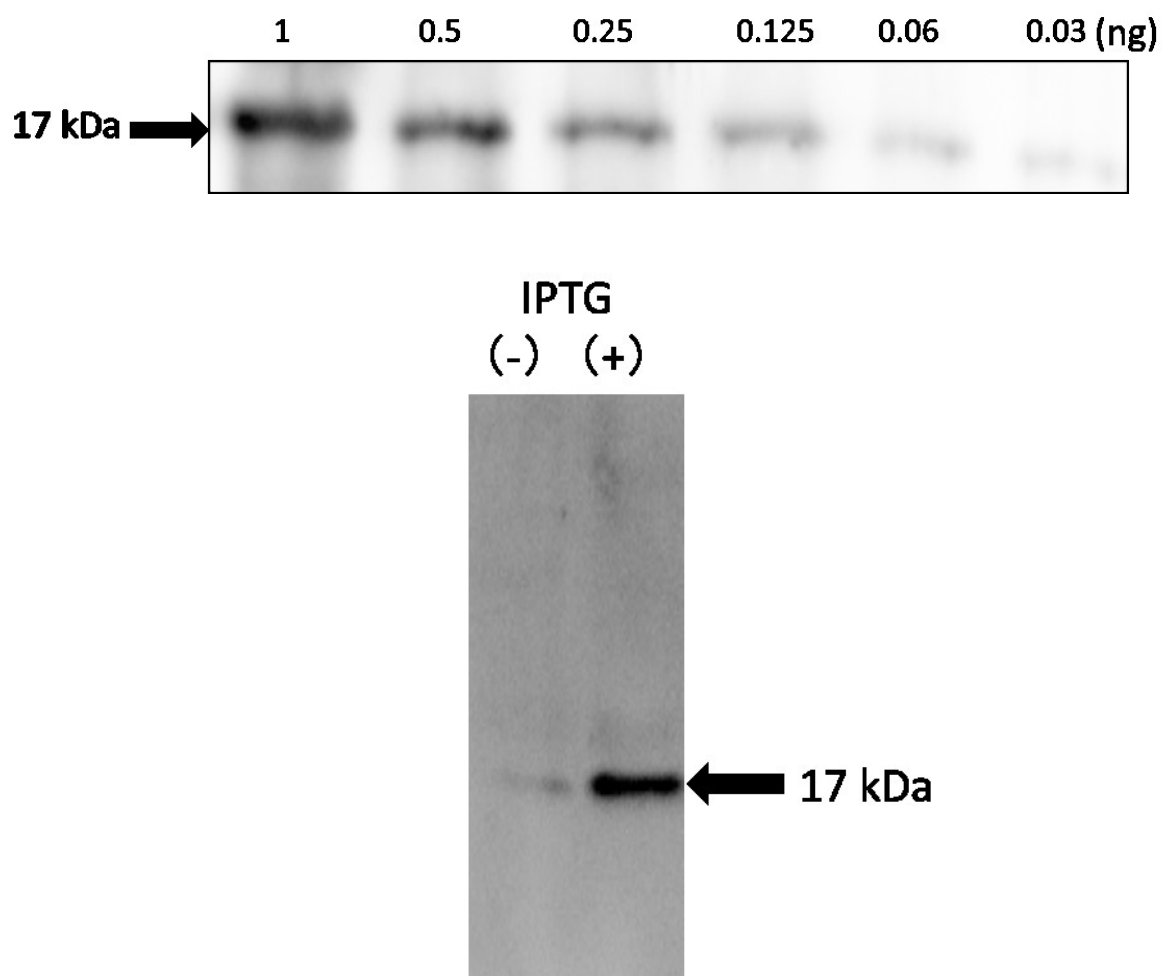


図 3 : Western blot による rAIF-1 の確認

上段 :  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-アガロースビーズにより精製した rAIF-1 を imidazol により溶出させ、段階的に希釈した後、SDS-PAGE (ゲル濃度 15%) を行った。泳動後、ナイロン膜に転写し抗 Iba-1 抗体により Western blot を行った。

下段 : IPTG 存在下または非存在下で得た細菌溶解液を、 $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-アガロースビーズに吸着させ精製し、抗 His 抗体を用いて Western blot を行った。

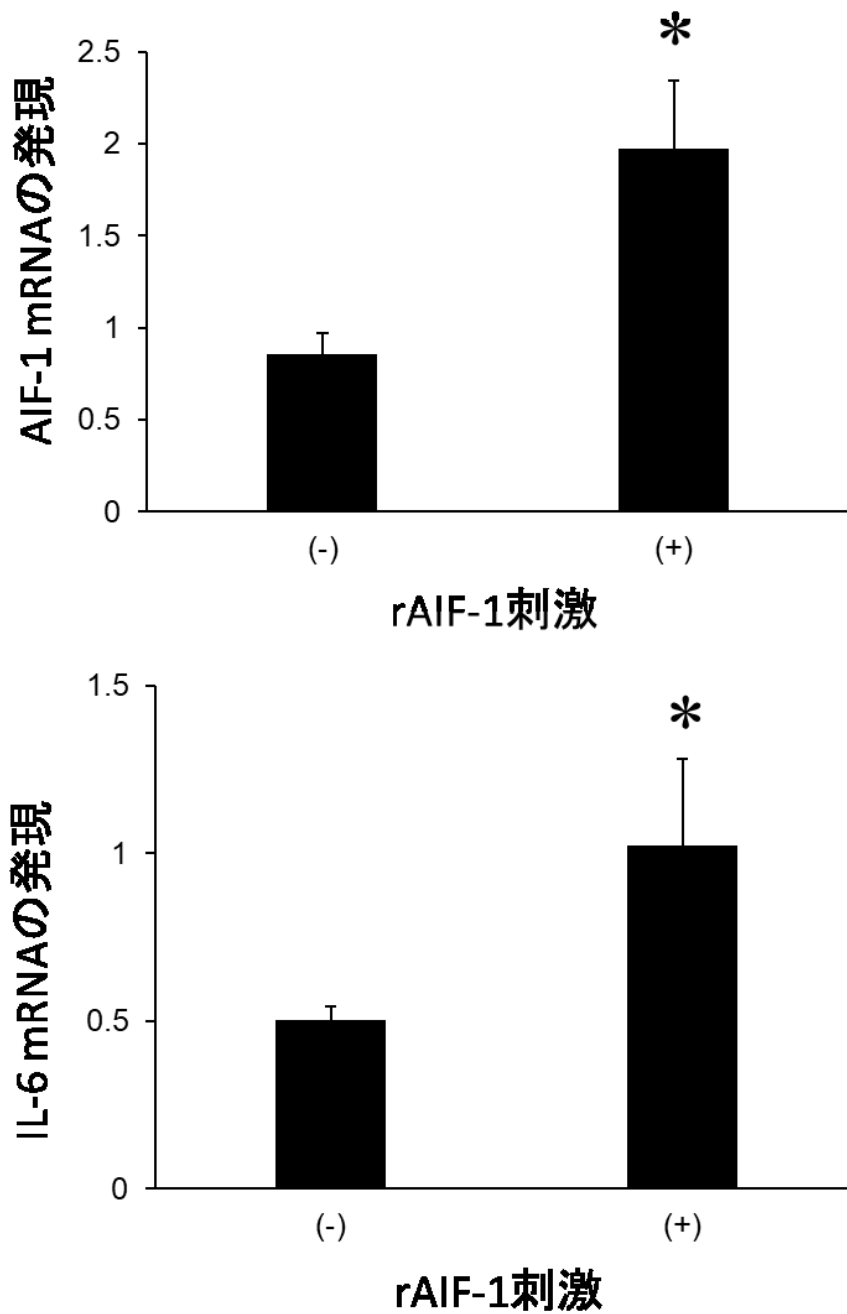


図4 : rAIF-1 による AIF-1 および IL-6 mRNA 発現誘導

マウスミクログリア細胞 MG6 を rAIF-1 (10 ng/ml) によって刺激し, AIF-1 および IL-6 mRNA の発現変化について real-time PCR により検討した。\*P<0.05 (n=3)

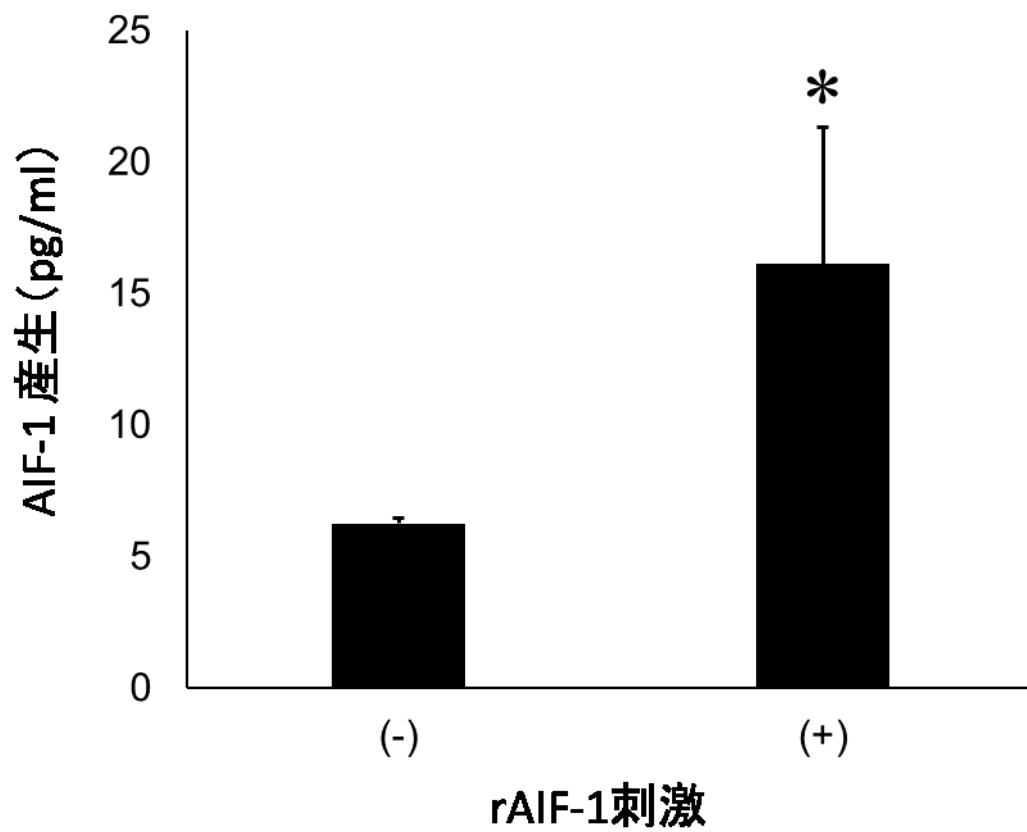


図5 ELISAによるAIF-1産生誘導の確認

図4と同様にMG6をrAIF-1存在下および非存在下で刺激し、18時間後に培養上清を回収した。上清中のAIF-1濃度をELISAにより測定した。\* $P < 0.05$  (n=4)