

論文の内容の要旨

氏名：武 元 智 子

博士の専攻分野の名称：博士 (歯学)

論文題名：propiece IL-1 α の核局在様式

Interleukin (IL)-1 α は分子量約 34 kDa の前駆体 (precursor IL-1 α ; pIL-1 α) として産生され、生体内ではユビキタスに存在する分子とされている。pIL-1 α は細胞質内で Ca²⁺依存性タンパク質分解酵素であるカルパイン、natural killer cell (NK) や好中球などが有する granzyme B (GzmB)、トロンビンなどによって分子のほぼ中央部分を切断され、N 末端側の propiece IL-1 α (ppIL-1 α) と C 末端側の mature IL-1 α (mIL-1) に分離する。mIL-1 は細胞外に分泌されサイトカインとして機能する。一方、同時に産生される ppIL-1 α の機能については、分子内に nuclear localizing sequence (NLS) を有していること、このために核内に局在し、ある種の遺伝子発現に関与していること、血管内皮細胞の migration に関係していることなどが明らかにされている。pIL-1 α を切断するカルパインは、ppIL-1 α と同様にユビキタスに存在するが、カルパインを有する細胞は同時にその阻害物質であるカルパスタチンを発現しており、このため pIL-1 α の切断は抑制されているとされている。しかし、マクロファージなどでは、細胞外刺激に応じてカルパインが活性化され、結果として mIL-1 α の産生と分泌が亢進するとされている。これまで、IL-1 α に関する研究は大部分が mIL-1 α に関するものであり、ppIL-1 α については、細胞内で検出されるのか否か、また、細胞外に放出され何らかの生物学的機能を有するのか否かなど、極めて多くの未解決な問題が残されている。ppIL-1 α は分子内に nuclear localizing sequence (NLS) を有しており、これまでの研究から核内に局在することが明らかとなっている。そこで本研究では、ppIL-1 α を transfection により強制発現させることにより、ppIL-1 α の核局在を確認するとともに、ppIL-1 α の有する NLS が機能しているのか、また、核内ではどのような状態で局在しているのかという点について検討することとした。

実験にはヒト子宮癌由来線維芽細胞である HeLa を用いた。細胞の培養は 10%ウシ血清を添加した Dulbecco's minimum essential medium にペニシリン・ストレプトマイシンを添加したものをを用い、37°C、5% CO₂ 存在下に培養した。ヒト pIL-1 α cDNA の N-末端に green fluorescence protein (GFP) を付加した発現 plasmid と、これを鋳型として quick change site-directed mutagenesis kit により NLS 7 アミノ酸を欠失させて Δ NLS mutant vector を作製した。それぞれのベクターを、ヒストン H2B に蛍光色素 mCherry を結合させた発現ベクター (H2B-mCherry) と co-transfection することにより細胞内局在について検討した。また、それぞれの発現 plasmid のタンパク発現を Western blot により確認した。用いた抗体はマウス抗 GFP 抗体と、2 次抗体として、horse radish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いた。核における ppIL-1 α の存在様式については、24-well plate に直径 10 mm の cover slip を入れ、HeLa (5 \times 10⁴/well) を播種し、これに transfection を行った。Transfectant に氷上で 0.1% triton X-100 溶液を作用させ、その後の蛍光色素の局在変化を蛍光顕微鏡により観察した。また、0.1% triton X-100 溶液の作用時間を変化させ、核内での他のタンパク質や染色体 DNA との結合の有無について検討した。さらに、エネルギー依存性の ppIL-1 α の核移行については、transfectant を PBS 中で、氷上 10 分間インキュベートすることにより行った。

その結果、無刺激の状態では ppIL-1 α は核内に局在することが確認された。NLS を欠失した mutant では、細胞質内に diffuse に拡散して存在したことから、ppIL-1 α 分子内の NLS が細胞内で機能していることが明らかとなった。さらに、wild type ppIL-1 α transfectant に氷上で 0.1% triton X-100 溶液を作用させると、5 分以内に GFP 陽性細胞は完全に消失した。一方、H2B-mCherry 由来の赤色蛍光および DAPI 由来の青色蛍光は消失することはなかった。一般に、核内タンパク質が染色体 DNA などに強固に結合している場合は、同処理によっても核内の蛍光は消失することはないことから、ppIL-1 α は核内で特定の構造物に結合して存在するのではなく、核質内に浮遊している可能性が示唆された。また、ppIL-1 α は PBS 中で氷上、10 分間反応させても核内に局在したことから、エネルギー非依存性に拡散しないことが解った。

ppIL-1 α はこれまでに、HS1-associated protein X-1 (HAX1) や necdin などのタンパク質と結合していることが報告されている。また、マウスのマクロファージにおいては、クロマチンと結合して存在する

とされている。しかし本研究において、氷上での 0.1% triton X-100 溶液のわずか 3 分間の処理により GFP 陽性細胞が消失したことから、HAX1 や necdin などの特定のタンパク質や DNA などと強固に結合している可能性は低いものと考えられた。一方、分子内の NLS が機能的に働いていることを考えると、ppIL-1 α が核に移行することは遺伝的に決定されていることであり、何らかの生物学的機能を担っている可能性を示唆している。ppIL-1 α がある種の遺伝子発現に関与しているという報告もあるが、今日までに ppIL-1 α の核移行のメカニズムは全く分かっていない。さらに、IL-1 α は、細胞が障害を受けた時に分泌される alarmin 分子であることが知られており、周囲の細胞・組織に、自身の置かれた危機的状況を知らせる分子である。こうした機能を発揮するためには、細胞外に放出されることが重要であり、ppIL-1 α が核内でどのような存在様式をしているのかを解明することは、IL-1 α の alarmin 分子としての全体像の理解には欠かせないものであると考える。これら多くの問題点の解決に向けて、今後さらなる検討が必要と考えられた。