

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主 査） 教授 鈴 木 直 人

（副 査） 教授 本 吉 満

教授 浅 野 正 岳

教授 白 川 哲 夫

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 は細胞質内でカルパインなどの酵素により、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) が生じる。mIL-1 は細胞外に分泌されサイトカインとして機能する。これまで、IL-1 α に関する研究は大部分が mIL-1 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って、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。

実験にはヒト子宮頸癌由来線維芽細胞 (HeLa) を用いた。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た 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 によるタンパク質発現を確認するため、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 抗体により Western blotting を行った。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 (5×10^4 /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、以下の知見を得た。

1. 無刺激の状態では ppIL-1 α は核内に局在し、NLS を欠失した mutant では細胞質内に diffuse に拡散して存在した。
2. 氷上で 0.1% triton X-100 溶液を作用させると、わずか 3 分間の処理により GFP 陽性細胞が消失し、5 分以内には完全に消失した。
3. 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。

以上より、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、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 はエネルギー非依存性に拡散しないことが解った。

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しめる分子である。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。

本研究の成果は、alarmin 分子の核内局在様式の一端を解明したものであり、細胞生物学上極めて

重要なものとする。

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