

propiece IL-1 α の核局在様式

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

武 元 智 子

(指導：本吉 満 教授, 浅野 正岳 教授)

要旨

【目的】 precursor interleukin-1 α (pIL-1 α) の酵素的切断により生じる propiece IL-1 α (ppIL-1 α) の細胞内局在様式について検討した。

【方法】 ppIL-1 α に green fluorescence protein (GFP) を付加した発現ベクター (wild type ppIL-1 α vector) および nuclear localization sequence (NLS)を欠失させた Δ NLS mutant vector を構築した。両タンパク質の発現は Western blot により確認した。核内での存在様式は wild type ppIL-1 α vector transfectant を triton X-100 溶液で氷上処理することにより検討した。エネルギー依存性に NLS が機能するか否かの確認は、氷上で PBS によって反応させ検討した。

【結果】 wild type ppIL-1 α および Δ NLS mutant は、共に 48 kDa のバンドとして検出された。ppIL-1 α は核内に、また Δ NLS mutant は細胞質内に diffuse に拡散して存在した。核内の GFP-wild type ppIL-1 α 蛍光は、氷上での triton X-100 溶液 5 分間処理により完全に消失した。また、ppIL-1 α の NLS はエネルギー依存性に機能していた。

【結論】 ppIL-1 α は細胞核内において浮遊状態で存在していると考えられた。また、ppIL-1 α の NLS はエネルギー依存性に機能を発揮する可能性が考えられた。

キーワード : propiece interleukin-1 α , nuclear localization sequence, alarmin

Abstract

[Purpose] Precursor interleukin-1 α (pIL-1 α) is intracellularly converted to propeptide IL-1 α (ppIL-1 α ; N-terminal portion) and mature IL-1 α (mIL-1 α ; C-terminal portion) by enzymes such as calpain. In this study, we investigated the mode of localization of ppIL-1 α in the nucleus.

[Method] The intracellular localization was examined by transfection with an expression vector wild type ppIL-1 α vector in which green fluorescence protein (GFP) was added to ppIL-1 α . The nuclear localization sequence (NLS)-deleted mutant (Δ NLS) vector was constructed by site-directed mutagenesis. The mode of existence in the nucleus was confirmed by treating the transfectant with a triton X-100 solution on ice. The energy-dependent nuclear localization was examined by incubating the transfectants with PBS on ice.

[Results] In the wild type ppIL-1 α vector transfectant and Δ NLS mutant vector transfectant, each protein was expressed as a single band at the position of 41 kDa by Western blot. In the untreated state, ppIL-1 α was localized in the nucleus, but the Δ NLS mutant was diffusely distributed in the cytoplasm. Treatment of the wild type ppIL-1 α vector transfectant on ice for 5 minutes with triton X-100 solution, but with PBS, completely abolished the fluorescence in the nucleus.

[Conclusion] It was clarified that ppIL-1 α does not exist in the cell nucleus by strongly binding to other proteins. In addition, it was considered that NLS of ppIL-1 α may exert its function in an energy-dependent manner.

Keywords: propeptide interleukin-1 α , nuclear localization sequence, alarmin

緒言

Interleukin (IL)-1 α は多くの種類の細胞で、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¹⁾。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^{2,3)}, natural killer cell (NK) や好中球などが有する granzyme B (GzmB)⁴⁾, トロンビン⁵⁾ 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 propeptide IL-1 α (ppIL-1 α) と C 末端側の mature IL-1 α (mIL-1) に分離する⁶⁾。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、酵素的切断により産生された 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¹⁾, 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⁷⁾, 血管内皮細胞の migration に関係していること⁸⁾ などが明らかにされている。pIL-1 α を切断する酵素として最初に同定されたカルパインは、pIL-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³⁾。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^{9, 10)}。また、ppIL-1 α は、実際に細胞内に存在するのか、細胞外に放出される可能性はあるのか、またどのような状況で放出されるのかなど、その生物学的機能とともに多くの未解決な問題が残されている。ppIL-1 α の遺伝子発現調節については、transfection により人為的に強制発現された細胞内で証明されたものであり⁷⁾, 内在性分子に関して証明されたわけではない。また、ppIL-1 α の有する NLS 配列は、動物種間で高い相同性を有する 7 残基のアミノ酸により構成されており^{11, 12)}, 転写調節の効果は、pIL-1 α よりも

強いとされている。しかし、細胞内在性の ppIL-1 α の本来の機能については不明なままである。

NLS 配列は様々な核内タンパク質が有する配列であるが、その配列は様々であり¹³、¹⁴、核内の DNA に強固に結合するものや、核質内に浮遊して存在するものなど多様である¹⁵。そこで本研究では、ppIL-1 α の有する NLS が機能的であるか否か、また、ppIL-1 α は核内で DNA や他のタンパク質と結合しているか否かについて検討することとした。

材料および方法

細胞

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%ウシ血清アルブミンを添加した Dulbecco's minimum essential medium (10% FCS-DMEM)にペニシリン・ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U S A)を添加したものをを用いた。

発現 plasmid の構築と transfection

Sata ら¹⁶⁾により作成された発現ベクター-wild type ppIL-1 α vector は, ppIL-1 α の N 末端に green fluorescence protein (GFP) を結合させたものである (図 1)。NLS 欠失 mutant vector は, wild type ppIL-1 α vector を鋳型として, quick change site-directed mutagenesis kit (タカラバイオ, 東京) を用いて作製し, NLS 7 残基アミノ酸に相当する DNA 配列を欠失させた。この発現ベクターを Δ NLS mutant vector として実験に供した。また, 蛍光色素 mCherry を結合したヒストン H2B を発現するベクター (H2B-mCherry, Addgene, Watertown, MA, U S A)と, コントロールとして GFP のみを発現するベクター¹⁶⁾を用いた。

24-well plate に直径 10 mm の cover slip を入れ, HeLa (5×10^4 /well) を播種した。Transfection は, それぞれの plasmid 125 ng を OPTI-MEM 25 μ L (GE Healthcare, Chicago, IL, U S A) に溶解し, 3000 reagent 1 μ L と混和した。一方, Lipofectamine 3000 (0.75 μ L) を OPTI-MEM 25 μ L に溶解した。両溶液を混合し, 室温で 15 分間反応させた。反応後培養液に添加し, 細胞と共に 18 時間培養し transfection した。Transfection 後 cover

slip を 37°C に加温した phosphate buffer saline (PBS) により洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド溶液に浸漬し、室温で 10 分間固定した。PBS により洗浄後、DAPI-fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, U S A) を用いて封入した。Transfection 後の細胞 (Transfectant) の観察および画像の撮影はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X810, キーエンス, 大阪) を用いて行った。

Western blot (WB)

Transfection 後、細胞を PBS で洗浄した。洗浄後、1% triton X-100/10 mM Tris-HCL (pH 8.0) により溶解し、14,000 × g, 2 分間遠心分離を行い、上清を新しいチューブに回収した。タンパク質濃度を protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, U S A) により測定し、100 μg の total protein を WB に供した。Sample を SDS sample buffer と混和し、95°C, 3 分間反応させた後、10% SDS-PAGE により電気泳動した。泳動後、ナイロン膜に転写し、1% BSA-PBS により非特異的反応のブロッキングを行った。1 次抗体としてマウス抗 GFP 抗体 (×500 倍希釈) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, U S A), 2 次抗体として horse radish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (×5,000 倍希釈) (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, U S A) を用いて反応させ、ECL kit (GE Healthcare) により発光させた。画像の取り込みは ChemiDoc (Bio-Rad) を用いて行った。

Transfectant の処理

ppIL-1α の核内での存在様式について検討するために、細胞を 0.1% Triton X-100/PBS

溶液により処理した。この処理により、核内に浮遊状態で存在しているタンパク質は、完全に除去され、核の蛍光は消失することが予測される¹⁷⁾ (図 2)。Wild type ppIL-1 α vector transfectant を 37°C に加温した PBS により洗浄後、細胞を氷上に移した。PBS を吸引除去したのち、0.1% Triton X-100/PBS 溶液を作用と 1, 2, 3, 5 および 10 分間氷上で反応させた。反応後 PBS により静かに洗浄後、4% パラホルムアルデヒドで固定した。一方、ppIL-1 α の核移行がエネルギー依存性であるか否かについて検討するために、transfectat を PBS により氷上で 10 分間反応させた。これによりエネルギー非依存性に核移行するタンパク質は自由拡散により拡散し、核の蛍光は消失すると考えられる。

成績

1. wild type ppIL-1 α および Δ NLS mutant の発現確認

作製した plasmid を用いて transfection した後、それぞれのタンパク質発現を、WB により確認した (図 3)。その結果、wild type ppIL-1 α および Δ NLS mutant ともに分子量 48 kDa の単一バンドとして検出された。一方、GFP 発現 plasmid を transfection した細胞では、28 kDa の位置に単一バンドが検出された (図 3)。また、細胞内における局在について確認したところ、wild type ppIL-1 α については核内に局限して存在することが確認され (図 4)、GFP の蛍光は H2B-mCherry および核を染色する DAPI の青色の蛍光と overlap した。一方、 Δ NLS mutant は細胞質内に diffuse に拡散し、核に蛍光が集積することはなく、H2B-mCherry および DAPI とは発現部位が異なっていた (図 4)。

2. Triton X-100 処理による GFP 蛍光発現の変化

次に、wild type ppIL-1 α の核内での存在様式を検討した。Transfectant を triton X-100 溶液によって処理したところ、未処理群で核内に局在していた蛍光は、triton X-100 溶液による 10 分間の処理によりほぼ完全に消失した (図 5)。次に、triton X-100 溶液による処理時間と核内の蛍光消失の関係を調べるため、transfectant を 1, 2, 3, および 5 分間処理した後に固定し観察した。その結果、処理 1 分後では、コントロールと比較して若干 GFP 蛍光を発する細胞数が減少した。GFP 蛍光を発する細胞の数は時間経過とともに減少し、処理 3 分後には GFP 陽性細胞数はほとんど消失した (図 6)。

3. エネルギー依存性の核移行

Wild type ppIL-1 α の核内移行がエネルギー依存性であるか否かについて検討した。すなわち, wild type ppIL-1 α の NLS がエネルギー非依存性に機能するのであれば, transfectant を氷上で反応させることにより自由拡散し, 核局在が消失するはずである。この可能性について検討したところ, 氷上での 10 分間の反応は核内の蛍光を消失させることはなかった (図 7)。

考察

pIL-1 α は 34 kDa のタンパク質として産生された後、種々の酵素によって切断され、ppIL-1 α と mL-1 α に分断される。pIL-1 α および ppIL-1 α には NLS が存在することから、核内で何らかの機能を発揮していることが考えられてきた¹⁾。Luheshi らは、IL-1 α が small G protein である Ran に依存して核内に移行することを示した¹⁸⁾。しかし、タンパク質の核内移行にはアダプター分子である importin family protein の結合が必須であり、IL-1 α に関してどのような分子が会合しているのか、詳細な研究はない。ppIL-1 α が核内で遺伝子の転写や⁷⁾、細胞の形質転換に関わっているという研究結果¹⁹⁾、また、種々の転写因子の活性化を介してリンパ腫由来の細胞の増殖を助長する²⁰⁾などの報告は、ppIL-1 α が核内で機能することを裏付けるものである。実際、核内で pIL-1 α と結合するものとしては HS1-associated protein X-1 (HAX1)^{21,22)} や necdin²³⁾ などが知られており、その機能は多岐にわたっている。しかし、核に移行した ppIL-1 α が、どのような様式で核に存在するのかという点については、マウスのマクロファージを用いた実験により、Lamacchia らがクロマチンと結合して存在することを報告している²⁴⁾のみであり、その詳細は不明である。一方、IL-1 α は、細胞が障害を受けた時に分泌される分子として知られている。こうした分子は alarmin と総称され²⁵⁾、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とされている。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 が核内でクロマチンに強固に結合していると alarmin としての機能を果たすための障害となるのではないかと考える。本研究では、ppIL-1 α の核内局在に、ppIL-1 α 中の NLS が有効に機能していることが明らかとなった。また、0.1% Triton X-100 溶液の作用により、

わずか1分間の処理で、核内の GFP-ppIL-1 α の蛍光強度が劇的に減弱し、DAPI や H2B-mCherry の蛍光と merge する細胞数が減少した。そして5分間の処理で、GFP-ppIL-1 α の蛍光は完全に消失した。このことは ppIL-1 α が、細胞核内で DNA や他のタンパク質などとは強固な結合をしておらず、核質内において浮遊状態で存在していることを示していた。pIL-1 α は核内で転写因子 HAX1^{21,22)} や細胞増殖抑制因子である necdin²³⁾ などのタンパク質と結合している可能性が示唆されている。また、マウスマクロファージにおいてはクロマチン DNA と結合しているとする報告²⁴⁾ があり、本研究の結果はこれらの報告と矛盾している。こうした矛盾点については今後さらに検討する必要があるものとする。

Cohen らは、細胞質内に存在する IL-1 α が、DNA に加わった障害を認識するセンサーであるとするデータを報告しており²⁶⁾、IL-1 α の機能に対して stressorin という用語を用いることを提唱している²⁶⁾。しかし、ppIL-1 α と mIL-1 α の機能的な違いにまでは言及していない。酵素的切断により産生される ppIL-1 α に関しては、この分子に対するモノクローナル抗体を作製し、これを用いて flow cytometry により間接的に検出を試みた報告がある²⁷⁾。しかしこの報告においても、明確に ppIL-1 α と pIL-1 α を区別していない。pIL-1 α を切断する酵素として最近報告されたトロンビン^{28,29)} は、免疫システムと血液凝固系の関連を指摘した論文として注目されているが、pIL-1 α は細胞膜画分にも局在していることが知られており^{28,29)}、この報告ではマクロファージや血小板の表面に局在する pIL-1 α がトロンビンにより切断され免疫系が賦活化されているとしており、これは ppIL-1 α と mIL-1 α が同時に細胞外で産生される可能性を示唆するものである。

以上のように、ppIL-1 α の機能については多くの点が未解決のままである。しかし、免疫系の賦活化に対して ppIL-1 α が果たす役割を解明することは、生体内における多くの免疫現象や疾患の根本的理解を深化させるために極めて重要であると考えている。

結論

未刺激の細胞において、ppIL-1 α は NLS 依存性に核内に局在している。しかし、ppIL-1 α は核内では HAX1 や necdin などの特定のタンパク質や DNA などに強固に結合したものではなく、核質内に浮遊して存在している可能性が示唆された。

文献

- 1) Di Paolo NC, Shayakhmetov DM (2016) Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol* 17, 906-913.
- 2) Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim J J, Matsushima K (1990) Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5548-5552.
- 3) Carruth LM, Demczuk S, Mizel SB (1991) Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 alpha precursor. *J Biol Chem* 266, 12162-12167.
- 4) Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP, Bots M, Lüthi AU, Reeves EP, McElvaney NG, Medema JP, Lavelle EC, Martin SJ (2011) Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1 α . *Mol Cell* 44, 265-278.
- 5) Burzynski LC, Humphry M, Pyrillou K, Wiggins KA, Chan JNE, Figg N, Kitt LL, Summers C, Tatham KC, Martin PB, Bennett MR, Clarke MCH (2019) The coagulation and immune systems are directly linked through the activation of interleukin-1 α by thrombin. *Immunity* 50, 1033-1042.
- 6) Afonina IS, Müller C, Martin SJ, Beyaert R (2015) Proteolytic processing of interleukin-1 family cytokines: Variations on a common theme. *Immunity* 42, 991-1004.
- 7) Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee J-K, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN (2004) The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2434-2439.
- 8) McMahon GA, Garfinkel S, Prudovsky I, Hu X, Maciag T (1997) Intracellular precursor

- interleukin (IL)-1alpha, but not mature IL-1alpha, is able to regulate human endothelial cell migration in vitro. *J Biol Chem* 272, 28202-28205.
- 9) March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, et al (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315, 641-647.
 - 10) Giri JG, Lomedico PT, Mizel SB (1985) Studies on the synthesis and secretion of interleukin 1. I. A 33,000 molecular weight precursor for interleukin 1. *J Immunol* 134, 343-349.
 - 11) Wessendorf JH, Garfinkel S, Zhan X, Brown S, Maciag T (1993) Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 alpha precursor. *J Biol Chem* 268, 22100-22104.
 - 12) Rider P, Carmi Y, Voronov E, Apte RN (2013) Interleukin-1alpha. *Semin Immunol* 25, 430-438.
 - 13) Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.
 - 14) Fontes MR, Teh T, Kobe B (2000) Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol* 297, 1183-1194.
 - 15) Cautain B, Hill R, de Pedro N, Link W (2015) Components and regulation of nuclear transport processes. *FEBS J* 282, 445-462.
 - 16) Sata E, Takada L, Kaetsu R, Fukasawa M, Ohtsu M, Motoyoshi M, Asano M (2020) A new

- enzyme-linked immunosorbent assay system against the N-terminal propiece of interleukin-1 α . *J Oral Sci* 62, 340-343.
- 17) Furuta M, Kose S, Koike M, Shimi T, Hiraoka Y, Yoneda Y, Haraguchi T, Imamoto N (2004) Heat-shock induced nuclear retention and recycling inhibition of importin alpha. *Genes Cells* 9, 429-441.
 - 18) Luheshi NM, Rothwell NJ, Brough D (2009) The dynamics and mechanisms of interleukin-1alpha and beta nuclear import. *Traffic* 10, 16-25.
 - 19) Stevenson FT, Turck J, Locksley RM, Lovett DH (1997) The N-terminal propiece of interleukin 1 alpha is a transforming nuclear oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 508-513.
 - 20) Zhang Y, Yu X, Lin D, Lei L, Hu B, Cao F, Mei Y, Wu D, Liu H (2017) Propiece IL-1alpha facilitates the growth of acute T-lymphocytic leukemia cells through the activation of NF-kappaB and SP1. *Oncotarget* 8, 15677-15688.
 - 21) Yin H, Morioka H, Towle CA, Vidal M, Watanabe T, Weissbach L (2001) Evidence that HAX-1 is an interleukin-1 alpha N-terminal binding protein. *Cytokine* 15, 122-137.
 - 22) Kawaguchi Y, Nishimagi E, Tochimoto A, Kawamoto M, Katsumata Y, Soejima M, Kanno T, Kamatani N, Hara M (2006) Intracellular IL-1alpha-binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1alpha in systemic sclerosis fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14501-14506.
 - 23) Hu B, Wang S, Zhang Y, Feghali CA, Dingman JR, Wright TM (2003) A nuclear target for interleukin-1alpha: interaction with the growth suppressor p53 modulates proliferation

- and collagen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10008-10013.
- 24) Lamacchia C, Rodriguez E, Palmer G, Gabay C (2013) Endogenous IL-1 α is a chromatin-associated protein in mouse macrophages. *Cytokine* 63, 135-144.
 - 25) Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17, 359-365.
 - 26) Cohen I, Rider P, Vornov E, Tomas M, Tudor C, Wegner M, Brondani L, Freudenberg M, Mittler G, Ferrando-May E, Dinarello CA, Apte RN, Schneider R (2016) IL-1 α is a DNA damage sensor linking genotoxic stress signaling to sterile inflammation and innate immunity. *Sci Rep* 5, 14756.
 - 27) Ross R, Grimmel J, Goedicke S, Möbus AM, Bulau AM, Bufler P, Ali S, Martin MU (2013) Analysis of nuclear localization of interleukin-1 family cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 387, 219-227.
 - 28) Brody DT, Durum SK (1989) Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *J Immunol* 143, 1183-1187.
 - 29) Stevenson FT, Bursten SL, Fanton C, Locksley RM, Lovett DH (1993) The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7245-7249.

図および表

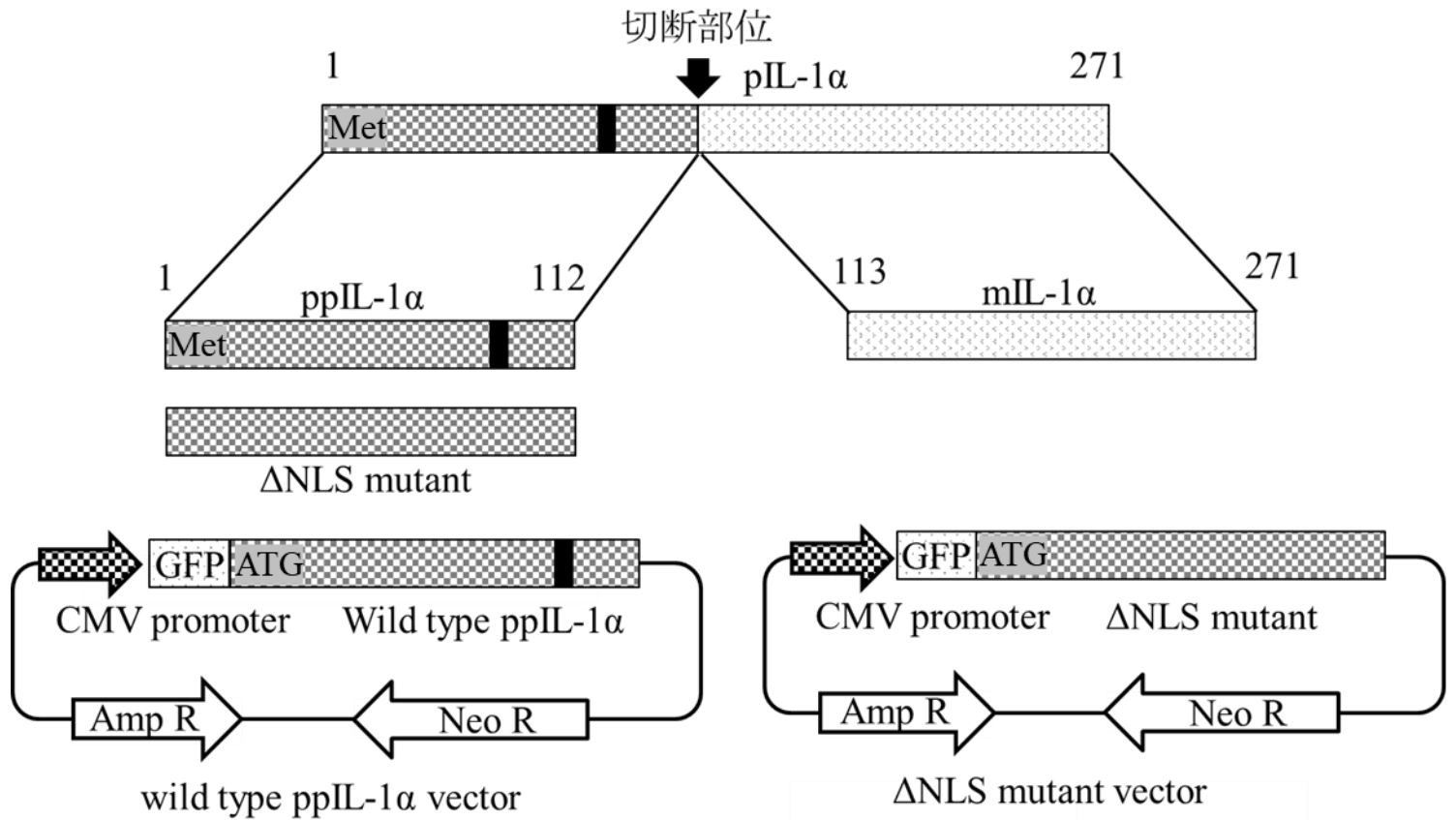


図1 IL-1αおよび発現ベクターの構造

pIL-1α分子のほぼ中央に酵素的切断部位が存在し、N末端側のppIL-1αとC末端側のmIL-1αに分離される。黒いバーはNLSを示し、ΔNLS mutant vectorでは核移行シグナルを除去している。数字はアミノ酸の位置を示す。

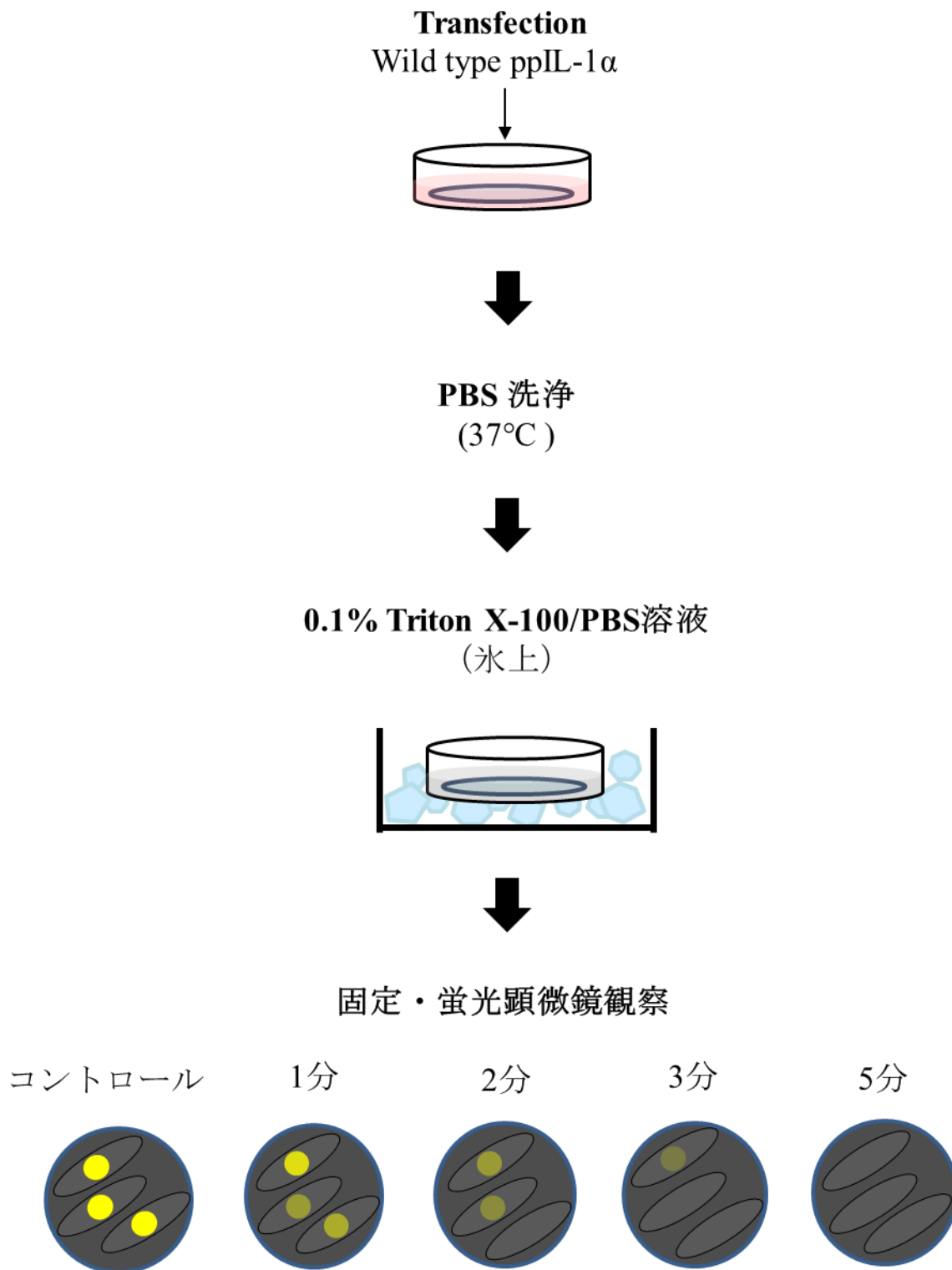


図2 Transfectantの処理

Transfectantを0.1% Triton X-100/PBS溶液により処理することにより，核内に浮遊状態で存在しているタンパク質は，完全に除去され，核の蛍光は消失する。

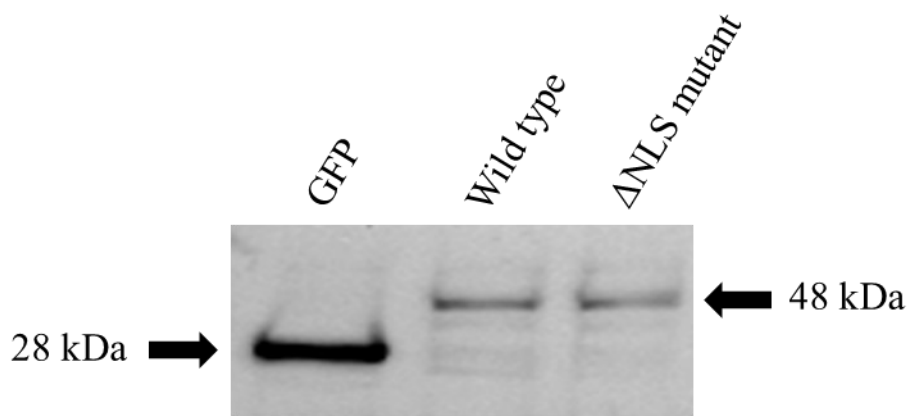


図3 タンパク質発現の確認

wild type ppIL-1 α , Δ NLS mutantおよびGFP発現plasmidをHeLaにtransfectionし、細胞溶解液を調整した。総タンパク量100 μ gを10% SDS-PAGEに泳動・展開し、WBを行った。1次抗体としてマウス抗GFP抗体 (\times 500倍希釈), 2次抗体としてHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (\times 5,000倍希釈) を用いた。

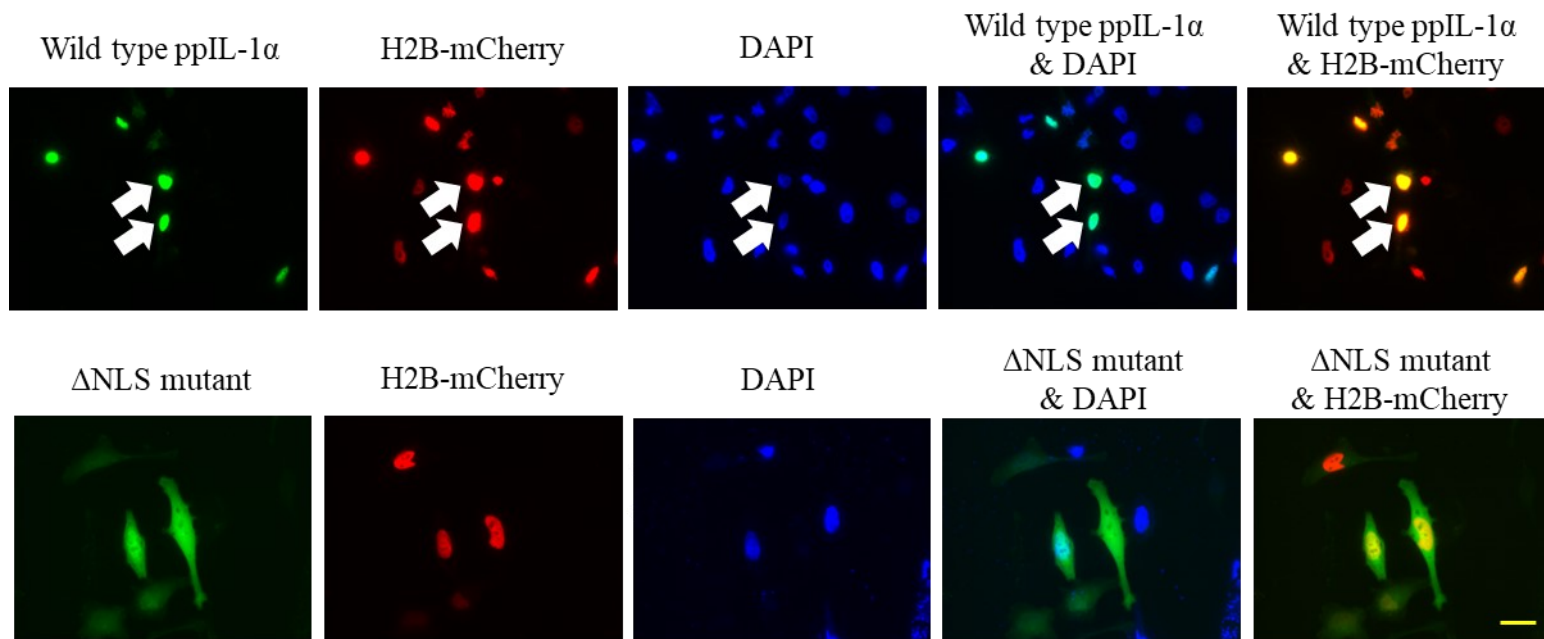


図4 細胞内におけるppIL-1 α の局在

Wild type ppIL-1 α および Δ NLS mutant発現ベクターをHeLaにtransfectionし、GFP蛍光の細胞内局在について観察した。それぞれの発現ベクターは、H2B-mCherryとco-transfectionし、DAPI含有の封入剤で封入した。スケール：10 μ m

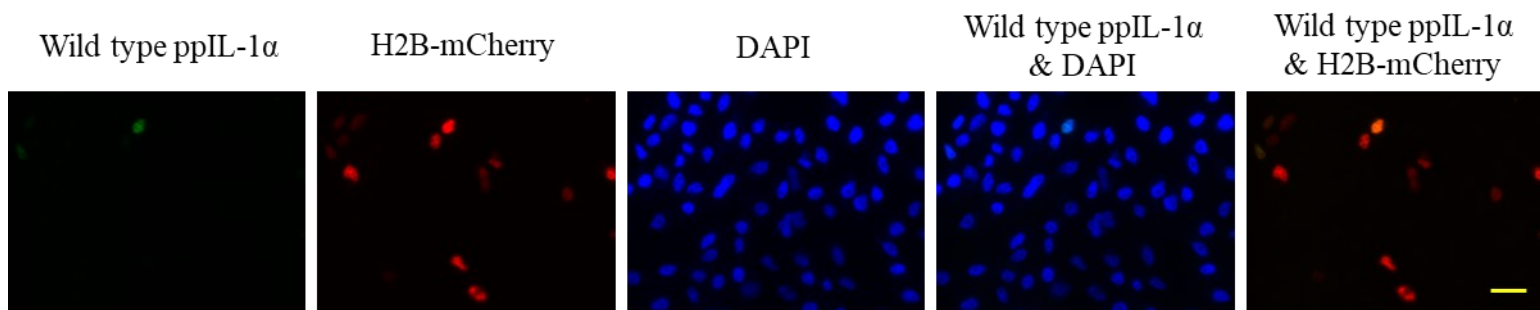


図5 Triton X-100処理によるGFP蛍光の消失

Wild type ppIL-1 α 発現ベクターをHeLaにtransfectionした後、氷上でtriton X-100溶液により10分間インキュベートし、その後GFP蛍光の細胞内局在の変化について観察した。図3と同様にH2B-mCherryとco-transfectionし、DAPI含有の封入剤で封入した。スケール：10 μ m

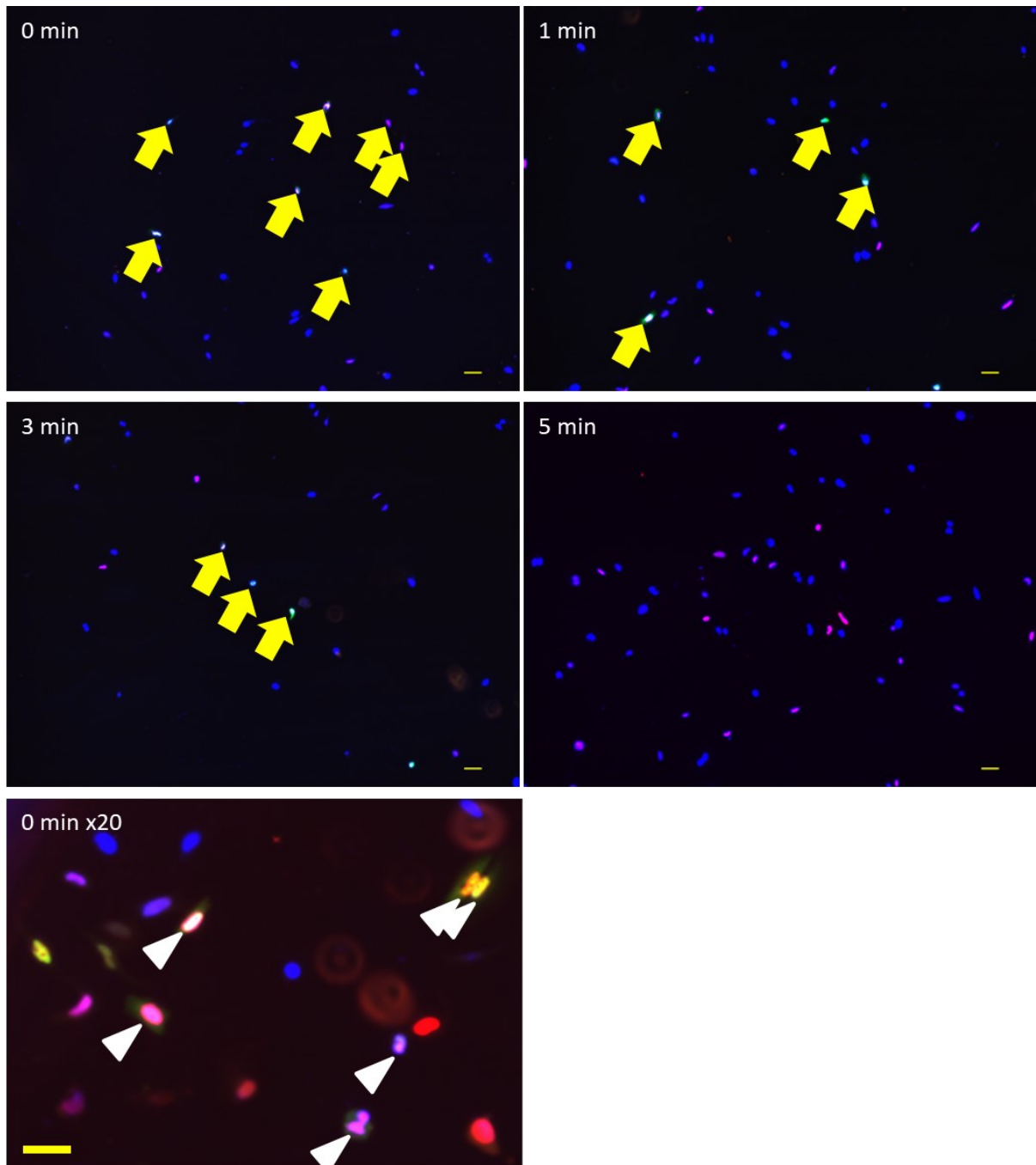


図6 処理時間依存的な核内蛍光の消失

Wild type ppIL-1 α transfectantにTriton X-100溶液を作用させて、氷上で0, 1, 3, および5分間反応させた。

反応後の細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡により撮影した。図中0, 1, 3, および5 minは対物レンズ $\times 10$ による画像。0 min $\times 20$ は対物レンズ $\times 20$ の画像。矢印および矢頭は、GFP-ppIL-1 α , H2B-mCherry およびDAPIの3色が重なった部分を示す。スケール：50 μm

赤色；H2B-mCherry

緑色；wild type GFP-ppIL-1 α

青色；DAPI

Wild type ppIL-1 α

H2B-mCherry

DAPI

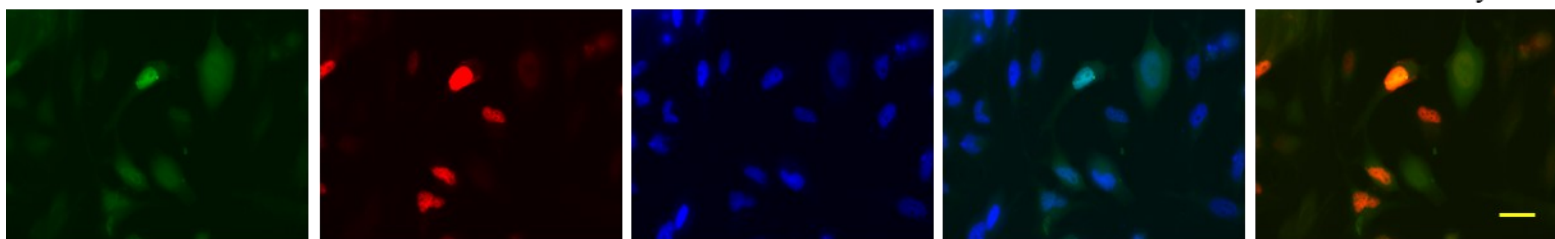
Wild type ppIL-1 α &
DAPIWild type ppIL-1 α &
H2B-mCherry

図7 エネルギー依存性の核移行

Wild type ppIL-1 α をHeLaにtransfectionした後、氷上でPBS中で10分間インキュベートした。GFP蛍光の細胞内局在の変化について観察した。図3と同様にH2B-mCherryとco-transfectionし、DAPI含有の封入剤で封入した。スケール：10 μ m