

論文の内容の要旨

氏名：佐々木 秀 人

博士の専攻分野の名称：博士 (歯学)

論文題名：Propiece IL-1 α の細胞内の局在と細胞障害による細胞外放出

Interleukin (IL)-1 α は IL-1 ファミリー分子群の中で、IL-1 β と共に最初に発見された分子である。それぞれ異なる遺伝子によりコードされ、アミノ酸レベルでの相同性は僅かに 27% である。しかし、共通したレセプターを介してシグナル伝達を行う、両者共に細胞内では前駆体として産生されたのち、酵素的に処理され、成熟型分子として細胞外に分泌される、さらに、いわゆる leader peptide を持たず、一般的な分泌タンパク質が辿る小胞体-ゴルジ装置を経由せずに分泌されるなどの共通点を有している。IL-1 β が炎症性サイトカインとしてその多彩な機能を発揮するのに対して、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、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。

IL-1 α は約 34 kDa の前駆体 (precursor IL-1 α ; pIL-1 α) として産生され、Ca²⁺依存性タンパク質分解酵素であるカルパイン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 α) に分離する。また pIL-1 α は natural killer cell や好中球などが有する granzyme B (GzmB) などによっても分解されることが明らかとなっている。このようにして生じた mIL-1 α は、細胞外に分泌されサイトカインとして機能するが、ppIL-1 α および pIL-1 α は分子内に存在する nuclear localizing sequence (NLS) のために、核内に局在するとされている。しかし、これまでに ppIL-1 α が細胞内に存在することを直接的に証明した報告はなく、また酵素的に切断された後に、ppIL-1 α が細胞外に放出されるのか否か、さらに放出された場合、どのような機能を有するのかなどについては全く解明されていない。

そこで本研究では IL-1 α の 3 種類の分子種のうち ppIL-1 α に着目し、その核局在を確認するとともに、酸化ストレスによる細胞障害に際して、細胞外に放出されるか否かという点について検討した。

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添加したものをを用い、37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。Sata らによって構築されたヒト IL-1 α の発現 plasmid (pcDNA-pIL-1 α , pcDNA-mIL-1 α および pcDNA-ppIL-1 α) を鋳型として、それぞれの N 末端に HiBiT tag を quick change site-directed mutagenesis kit を用いて付加した。これらの plasmid は、酸化ストレス下における 3 種の IL-1 α 分子の放出率を測定するために用いた。また、ppIL-1 α の核内局在を検索する目的で pEGFP vector に ppIL-1 α をサブクローニングしたものを pEGFP-ppIL-1 α とした。Transfection 実験は Lipofectamine 3000 を用いて行った。ppIL-1 α の核内局在の確認のためには、24-well plate に直径 10 mm の cover slip を入れ、HeLa 細胞を 5×10^4 /well で播種し transfection を行った。transfection 後、cover slip 上の細胞を 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 を用いて封入し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。また、同様に transfection した細胞を 1 μ M H₂O₂ 存在下または非存在下に培養後、細胞内の蛍光の変化について観察した。一方、酸化ストレス下の細胞外放出については、HeLa 細胞 (5×10^4 /48-well plate) に 3 種の IL-1 α 発現 plasmid を transfection した後、細胞を 1 μ M H₂O₂ 存在下または非存在下で 3 時間培養した。培養後、培養上清と細胞溶解液を回収し、それぞれのサンプル中の蛍光活性を Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System により測定した。放出率の計算は、細胞溶解液中および培養上清中の蛍光強度の合計に対する培養上清中の蛍光強度の割合を計算することにより算出した。

その結果、無刺激の状態では ppIL-1 α は主に核内に局在することが確認された。また極めて少量ではあるが細胞質内にも diffuse に認められた。pEGFP-ppIL-1 α transfectant を 1 μ M H₂O₂ 存在下で培養したところ、核内および細胞質内に観察された蛍光はほぼ完全に消失した。次に HiBiT tag を付加した vector を transfection し、同様に 1 μ M H₂O₂ 存在下または非存在下 (コントロール) で培養し、細胞外に放出されたそれぞれの IL-1 α 量について測定したところ、ppIL-1 α は $54.1 \pm 23.5\%$ 、pIL-1 α は $52.5 \pm 9.7\%$ 、mIL-1 α は $68.4 \pm 18.8\%$ が放出されたことが明らかとなり、3 種の分子間の放出率に有意差は認められなかつ

た。しかしいずれの放出率もコントロールと比較して、酸化ストレスによる有意な上昇が認められた。

以上の結果から ppIL-1 α は、無刺激の状態では大部分が核に局在することが解った。一方、酸化ストレス下では核内の ppIL-1 α はほぼ完全に消失した。この結果は、HiBiT tag を付加した ppIL-1 α 発現 plasmid を用いた実験でも裏付けされた。このことから、ppIL-1 α は alarmin として機能する可能性が示され、ppIL-1 α の細胞外機能について今後さらなる検討が必要と考えられた。