

Propiece IL-1 α の細胞内の局在と細胞障害による細胞外放出

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

佐々木 秀人

(指導：浅野正岳教授)

要旨

Interleukin (IL) -1 α は、前駆体 (precursor IL-1 α ; pIL-1 α) として産生され、細胞内でカルパインなどの酵素により、N 末端側の propeptide IL-1 α (ppIL-1 α) と C 末端側の mature IL-1 α (mIL-1 α) に切断される。本研究では ppIL-1 α の核内局在と、酸化ストレス下で 3 種類の IL-1 α が細胞外に放出されるか否かについて検討した。

細胞内での局在については、ppIL-1 α に green fluorescence protein (GFP) を付加した発現ベクターを transfection することにより検討した。また、IL-1 α の細胞外放出については、3 種の IL-1 α の N 末端に HiBiT 配列を付加した plasmid を構築し、transfection により検討した。すなわち、transfectant を 1 μ M H₂O₂ 存在下または非存在下で培養後、培養上清および細胞溶解液中の蛍光強度を Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System を用いて測定し、培養上清中の蛍光強度を、培養上清中と細胞溶解液中の蛍光強度に対する比として算出し比較した。

その結果、ppIL-1 α は主に核内に局在することが確認された。また、核内の ppIL-1 α は酸化ストレスにより大部分が細胞外に放出された。HiBiT tag を用いた実験から、3 種の IL-1 α はいずれも酸化ストレス下でコントロールと比較して、有意に細胞外に放出されることが解った。また、この放出率は分子種間で有意な差は認められなかった。

以上の結果から、酸化ストレスのない状態では、ppIL-1 α は細胞核内に局在し、酸化ストレスなどの細胞障害によって細胞外に放出され、alarmin として機能する可能性が示唆された。

緒言

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¹⁾。それぞれ異なる遺伝子によりコードされ²⁾、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い、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 (図 1)、成熟型分子として細胞外に分泌され³⁾、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⁴⁾。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⁵⁾、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 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⁾。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⁷⁾。このようにして産生された 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) (図 1) のために、核内に局在するとされている³⁾。IL-1 α 分子内の NLS の 7 アミノ酸配列は、動物種間で高い相同性を有している。

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、その分子の核内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。

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た。

発現 plasmid の構築と transfection

Sata ら⁸⁾により作成された発現ベクター (pcDNA-pIL-1 α , pcDNA-mIL-1 α および pcDNA-ppIL-1 α vector) を鋳型として, quick change site-directed mutagenesis kit (Agilent, Santa Clara, CA, U S A) を用いて N-末端に HiBiT 配列を付加した。この発現ベクターを HiBiT-pIL-1 α , HiBiT-mIL-1 α および HiBiT-ppIL-1 α vector (図 2) として 3 種のヒト IL-1 α 分子の細胞外放出について検討する実験に用いた。また, pEGFP vector および pEGFP-ppIL-1 α vector⁸⁾ は細胞内局在を検討するための実験に用いた。

Transfection は, Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U S A) を用いて行った。すなわち, それぞれの plasmid 125 ng を OPTI-MEM (25 μ L) (Thermo Fisher Scientific) に溶解し, 3000 Reagent (1 μ L) (Thermo Fisher Scientific)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 時間培養した。

ppIL-1 α の核局在の確認

24-well plate に直径 10 mm の cover slip を入れ, HeLa 細胞を 5×10^4 /well にて播種し

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 (SouthernBiotech, Birmingham, L, USA) を用いて封入した。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。

3 種の IL-1 α の細胞外放出

48-well plate に播種した HeLa 細胞 (5×10^4 /well) に 3 種の IL-1 α 発現 plasmid を transfection した後, 1 μ M H₂O₂ 存在下または非存在下 (コントロール) に 3 時間培養した。培養後, 培養上清を回収した。培養 dish 上の細胞を PBS により洗浄し, 細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% TritonX-100) を加え, 氷上で 3 分間反応させた後回収した。それぞれのサンプル中の蛍光活性を Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System (Promega, Madison, WI, USA) により測定した。蛍光の測定にはルミノメーター (GloMax 20/20, Promega) を用いた。

統計学的解析

放出率は, [培養上清中の HiBiT 活性/(細胞溶解液中の HiBiT 活性+培養上清中の HiBiT 活性)] $\times 100$ として算出し, H₂O₂ 処理の有無における放出率の有意差は χ^2 検定を使用した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

1. ppIL-1 α の細胞内局在

ppIL-1 α の細胞内局在について N 末端に GFP を付加した plasmid を用いて検討した。その結果, pEGFP-ppIL-1 α を transfection した細胞では, 核内に強い蛍光が検出された (図 3, 上段)。すなわち ppIL-1 α の発現は, DAPI 陽性の細胞核に見られ, merge 像では青緑色の蛍光として確認された。また, ppIL-1 α は細胞質内にも弱く diffuse に認められた (図 3, 上段)。一方, GFP のみを発現させた細胞では, 細胞質全体に蛍光が観察され, 核のみに局在する様な所見は見られなかった (図 3, 下段)。

2. 酸化ストレスが ppIL-1 α の局在に及ぼす影響

ppIL-1 α の細胞内局在が, 酸化ストレスによる細胞障害でどのように変化するかを検討した。すなわち transfectant を 1 μ M の H₂O₂ で処理し, 処理前後における蛍光の変化について観察した。その結果, pEGFP-ppIL- α transfectant において, DAPI の蛍光強度には変化が認められなかったが, GFP の蛍光はほぼ完全に消失した (図 4)。

3. 酸化ストレスが IL-1 α の放出率に及ぼす影響

H₂O₂ 処理による酸化ストレスにより GFP-ppIL-1 α が細胞外に放出されることが示されたため, 細胞外に放出される ppIL-1 α の定量をした。すなわち, 図 2 に示した plasmid を用いて ppIL-1 α の放出率を算出し, pIL-1 α および mL-1 α の放出率と比較した。その結果, 図 5 に示した通り, ppIL-1 α は $54.1 \pm 23.5\%$, pIL-1 α は $52.5 \pm 9.7\%$, mL-1 α は $68.4 \pm 18.8\%$ であったが, これら 3 種の IL-1 α 放出率には有意な差は認めら

れなかった。一方、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 (図 5)。

考察

細胞が障害を受けたときに細胞外に放出される物質は **alarmin** と呼ばれ、**IL-1 α** や **high mobility group box-1** など様々な分子がある⁵⁾。これらは、分子内に DNA 結合領域を有すること、細胞内で **precursor** として産生されること、また多くの細胞に恒常的に産生されることなどの共通点を持っている⁵⁾。

IL-1 α は細胞内で分子量約 34 kDa の前駆体として産生されたのち、酵素的に分解され、**ppIL-1 α** と **mIL-1 α** に分離する³⁾。**mIL-1 α** はサイトカインとして細胞外で機能するが、**pIL-1 α** も細胞の壊死などに伴って細胞外に放出され、ともに共通のレセプターに結合し、**IL-6** などのサイトカイン産生を誘導することが明らかになっている⁹⁾。しかし、酵素的切断後に生じる **ppIL-1 α** の機能については全く報告がない。**IL-1 α** を切断する酵素はカルパイン⁶⁾ や **GzmB** など⁷⁾ がある。このうち **GzmB** は好中球などで産生され、細胞外に分泌されることが明らかになっており、細胞外に放出された **pIL-1 α** が **GzmB** などと会合し、細胞外で **ppIL-1 α** が産生される可能性もある。

pIL-1 α および **ppIL-1 α** は NLS を有しており、このため細胞内では主に核内に存在するとされている³⁾。本研究では **ppIL-1 α** に GFP を結合させた plasmid を transfection することにより細胞内局在について検討し、**ppIL-1 α** が核内に局在することを確認した。また、**H₂O₂** による酸化ストレス下では、核内に局在していた **ppIL-1 α** の大部分が消失した。このことは **IL-1 α** が **alarmin** として機能しており、その N 末端部分を構成する **ppIL-1 α** も同様に **alarmin** として機能することを示すものであった。また、**ppIL-1 α** の細胞外放出率を、HiBiT 法により定量したところ、**mIL-1 α** よりは低いものの、**pIL-1 α** とは有意な差が認められなかった。前述のとおり、**ppIL-1 α** は細胞外でも生じ

る可能性があり、この結果と考え合わせると、ppIL-1 α の細胞外機能の検討は極めて重要であると考ええる。Sata ら⁸⁾ は、ヒト ppIL-1 α の N 末端にヒスチジン tag を付したリコンビナントタンパク (His-ppIL-1 α) を作製し、これで免疫することにより ppIL-1 α を認識する抗体を得ている。ここで用いた His-ppIL-1 α を種々の培養細胞に作用させ、サイトカイン産生の有無を網羅的に解析することにより、ppIL-1 α の細胞外機能の検討が可能であると考えている。本研究では、酸化ストレス下での ppIL-1 α の放出について検討したが、この他に細胞に障害を与える刺激としては、温熱刺激、低酸素状態などがある。これらの刺激に対する放出率を比較することは、IL-1 α の 3 分子種の個別の機能解析のために有用であると考ええる。

Cohen らは¹⁰⁾ 細胞障害によって DNA 損傷が生じたときに、pIL-1 α が損傷を受けた染色体 DNA 上に集積し、さらに細胞外に放出されることにより alarmin としての機能を果たすとしている。このことから、pIL-1 α をストレスに伴って放出される分子であるとし、stressorin という用語を用いることを提唱している¹¹⁾。本研究では、酸化ストレス下で ppIL-1 α が核内の特定部位に集積するような結果は得られなかった。

本研究の結果、細胞障害により pIL-1 α と同様に ppIL-1 α も細胞外に放出され、その放出率も pIL-1 α に匹敵するものであることが判明した。ppIL-1 α の細胞外機能の追究は、alarmin の制御を可能にし、これを様々な病態の改善に応用できる可能性があり、意義深いものと考ええる。

結論

酸化ストレスのない状態では核内に局在する ppIL-1 α は、酸化ストレスによって細胞外に放出されることが明らかになった。このことから、ppIL-1 α は alarmin として機能すると推測された。

謝辞

本研究の推進にあたり、病理学講座 浅野正岳教授および講座員の皆様にご指導頂いた。ここに深甚なる感謝の意を表す。

文献

- 1) Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA (1984) Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 7907-7911.
- 2) March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, Conlon PJ, Hopp TP, Cosman D (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315, 641-647.
- 3) Di Paolo NC, Shayakhmetov DM (2016) Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol* 17, 906-913.
- 4) Monteleone M, Stow JL, Schroder K (2015) Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* 74, 213-218.
- 5) Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses, *Curr Opin Immunol* 17, 359-365.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.

- 9) Kim B, Lee Y, Kim E, Kwak A, Ryoo S, Bae SH, Azam T, Kim S, Dinarello CA (2013) The interleukin-1 α precursor is biologically active and is likely a key alarmin in the IL-1 family of cytokines. Front Immunol 4, 391.
- 10) Cohen I, Rider P, Voronov 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.
- 11) Rider P, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN, Cohen I (2017) Alarmins: Feel the stress. J Immunol 198, 1395-1402.

図および表

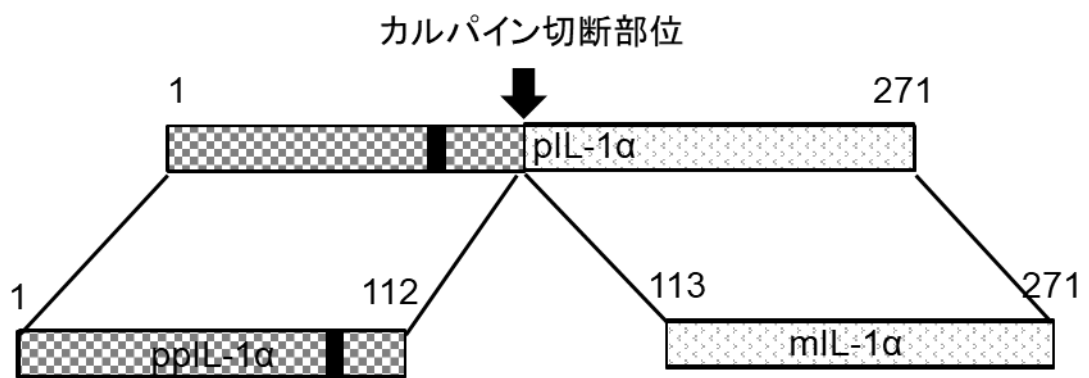


図1 IL-1 α の構造

IL-1 α はpIL-1 α として細胞内で産生されたのち、カルパインなどにより分子のほぼ中央部を酵素的に切断され、N末端側のppIL-1 α とC末端側のmIL-1 α に分離される。図中の数字はアミノ酸の位置を示す。黒バーはNLSを示す。

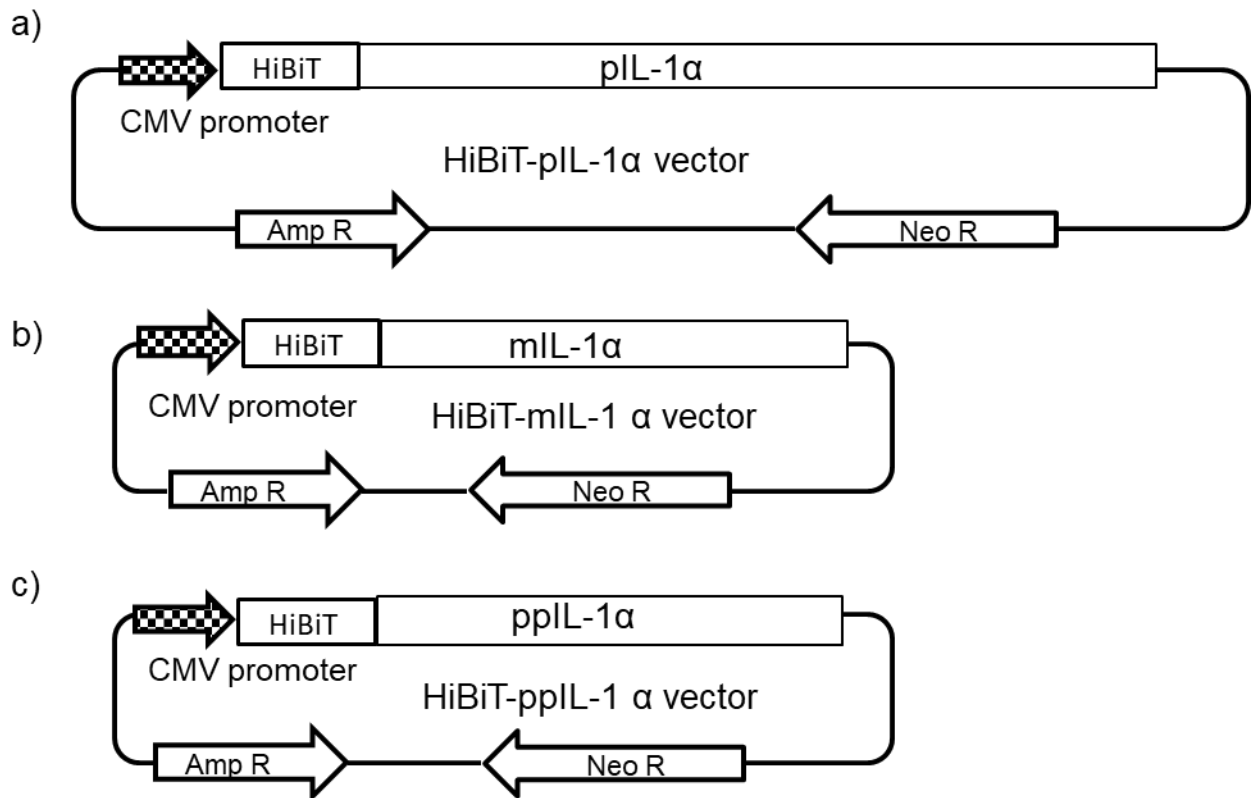


図2 実験に用いた発現 vector

哺乳動物の発現ベクターである pcDNA に a) pIL-1 α , b) mIL-1 α および c) IL-1 α を挿入した。それぞれの N 末端部に quick change site-directed mutagenesis kit を用いて HiBiT 配列を添加し、細胞外放出実験に用いた。

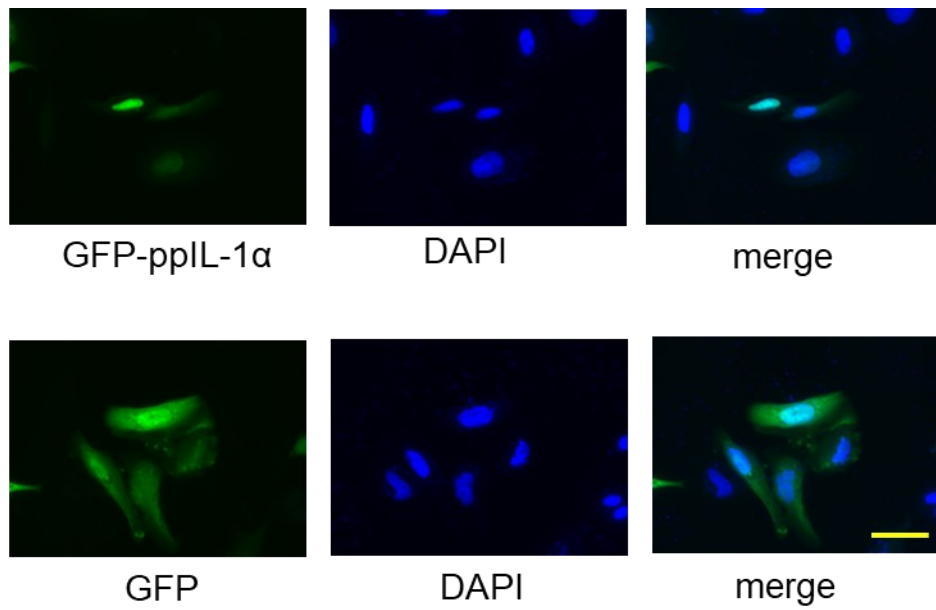


図3 ppIL-1 α の細胞内局在

pEGFP-ppIL-1 α (上段) vector および pEGFP (下段) を transfection し、細胞内局在について検討した。ppIL-1 α は核に局在している。
スケール：20 μ m

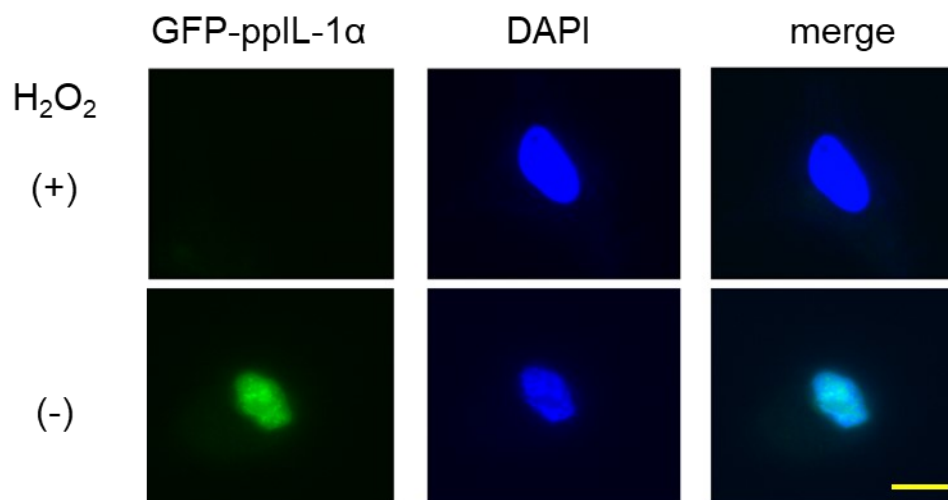


図4 酸化ストレス下でのppIL-1 α の細胞内局在の変化

pEGFP-ppIL-1 α vectorをtransfectionした後，細胞を1 μ Mの H₂O₂ 存在下 (+) または非存在下 (-) で培養し，細胞内局在の変化について検討した。核内の蛍光強度は酸化ストレスを加えることにより消失した。
スケール：10 μ m

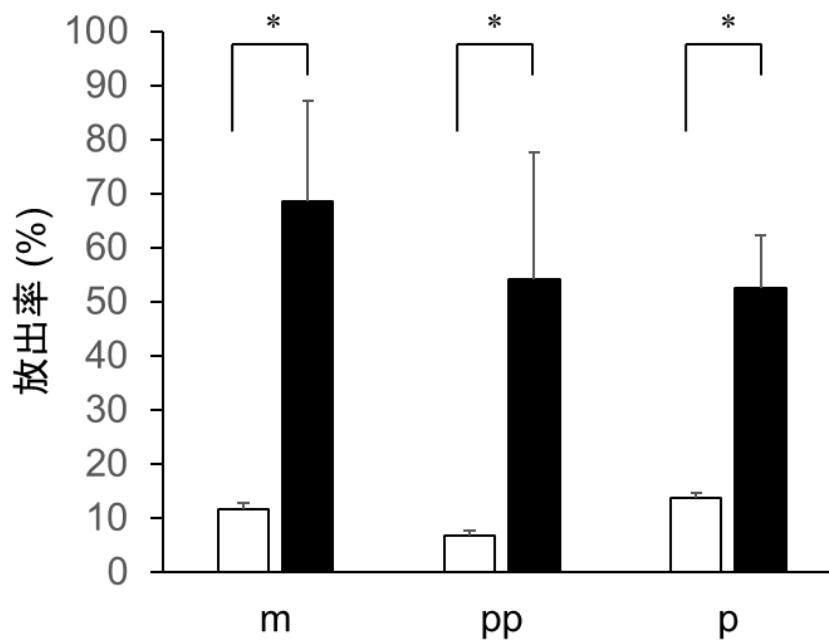


図5 ppIL-1 α の細胞外放出率

HeLa 細胞にHiBiT-mIL-1 α (m), HiBiT-ppIL-1 α (pp) および HiBiT-pIL-1 α (p) vectorを transfectionした後、細胞を1 μ MのH₂O₂存在下 (黒バー) または非存在下 (白バー) で3時間培養した。培養後、上清と細胞溶解液を回収し、Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System を用いて放出率を定量化した。独立した実験を5回行い、結果は平均値 \pm 標準偏差により表した。

χ^2 検定により統計処理を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した(*)。