

論文の内容の要旨

氏名：高田 礼央

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：In vitro transcription/translation 法により作製した mature interleukin-1 α と propeptide interleukin-1 α の機能比較

障害を受けた細胞が、自らの置かれた危機的な状況を周囲に知らしめるために放出する物質は danger-associated molecular patterns (DAMPs) または alarmin と総称される。Alarmin には、interleukin (IL)-1 α 、IL-33 や high-mobility group box-1 (HMGB1) などがある。

IL-1 α は約 34 kDa の前駆体 (precursor IL-1 α ; pIL-1 α) として細胞内で産生される。pIL-1 α の Ca²⁺ 依存性タンパク質分解酵素であるカルパインや、好中球などが産生する granzyme B (GzmB) などによる分子のほぼ中央部分での切断によって、N 末端側の propeptide IL-1 α (ppIL-1 α) と C 末端側の mature IL-1 α (mIL-1) が生じる。従って IL-1 α 分子には pIL-1 α 、mIL-1 α および ppIL-1 α の 3 種類の分子種が存在する。この中で ppIL-1 α は、分子内に nuclear localizing sequence (NLS) が存在し、主に核に局在すると報告されている。しかし、その機能は、遺伝子発現に関与する可能性が指摘されている以外には全く不明である。そこで本研究では、mIL-1 および ppIL-1 α のサイトカイン産生誘導能の違いについて、in vitro transcription/translation 法により作製した recombinant タンパク質を用いて検討することとした。

Recombinant mIL-1 α (rmIL-1 α) および rppIL-1 α の作製は、in vitro translation/transcription 法を用いて行った。使用したベクターは、発現ベクターである pcDNA に mIL-1 α または ppIL-1 α の cDNA を挿入し、それぞれを、pcDNA-mIL-1 α および pcDNA-ppIL-1 α とし使用した。

ベクターの形状による recombinant タンパク質の産生量の違いを比較するため、pcDNA-mIL-1 α ベクターを制限酵素 *Xho* I により直鎖化したベクターと、直鎖化していないベクターを用いて、in vitro transcription/translation 反応を行った。rmIL-1 α の分子量は western blot により確認し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により産生量を測定した。

一方、rppIL-1 α の分子量は、反応産物を段階的に希釈したものをを用いて western blot により確認した。また、rppIL-1 α の定量は、ウシ血清アルブミン水溶液を段階的に希釈し、10% sodium dodecyl persulfate (SDS) ポリアクリルアミド電気泳動により展開し、Coomassie Brilliant Blue 染色し、バンドの濃度を Image J により測定することによって検量線を作製し行った。

mIL-1 α および ppIL-1 α のサイトカイン産生誘導能の比較は、肺腺癌由来 A549 細胞を用いて検討した。A549 細胞の培養は、10% ウシ胎児血清 (FCS) を添加した Dulbecco's minimum essential medium DMEM (10%FCS-DMEM) を使用した。

その結果、recombinant タンパク質は、環状および直鎖化したベクターを等量用いることにより、ほぼ同量産生されることが解った (各ベクター 100 ng に対して、環状ベクター 6.1 ± 0.2 ng/ μ L、直鎖化したベクター 5.4 ± 0.8 ng/ μ L)。western blot の結果、rmIL-1 α および rppIL-1 α は、それぞれ 19 kDa および 18 kDa の単一バンドとして検出され、rppIL-1 α は、希釈倍率に応じてバンドの濃度が減少した。以上のことから、in vitro transcription/translation 反応により rmIL-1 α および rppIL-1 α が産生されていることが確認できた。

A549 に、段階的に希釈した rmIL-1 α を作用させ、ELISA により培養上清中の IL-6 および IL-8 量を測定したところ、rmIL-1 α の濃度依存性に IL-6 および IL-8 の両サイトカインの産生が増強されることが明らかとなった。産生量は、100 倍希釈した rmIL-1 α によって、IL-6 は、 486 ± 25 pg/mL、IL-8 は、 68.4 ± 0.4 ng/mL であった。このことから、A549 細胞は、rmIL-1 α に反応して、IL-6 に比して、より高濃度の IL-8 を産生することが明らかとなった。

次に、rppIL-1 α の A549 細胞に対する IL-8 産生誘導能について、rmIL-1 α と比較した。pcDNA によるコントロール反応で得た溶液では、IL-8 産生はネガティブコントロール (無刺激の培養液) と同程度であった。rmIL-1 α では 4.1 ± 0.2 ng/mL の IL-8 産生が確認され、pcDNA による反応産物と比較して有意に IL-8 産生が増強された。一方、rppIL-1 α による刺激では、IL-8 産生は、コントロールとほぼ

同程度であった。以上の結果は、A549 細胞は rmIL-1 α に反応して IL-8 産生を惹起するが、rppIL-1 α に対しては全く反応しないことを示していた。

本研究では、in vitro transcription/translation 反応により得た rmIL-1 α が、サイトカイン誘導能を有しており、in vitro における IL-1 α 研究に応用しうることを、また、同様の方法で得た rppIL-1 α には IL-8 産生誘導能が無いことを明らかにした。このことは、IL-8 産生誘導能が、pIL-1 α の N 末端領域に依存するものではない可能性を示唆するものであり大変興味深いものであった。これまで ppIL-1 α の細胞外機能の検討は全く行われておらず、本研究が、IL-1 α の新たな機能の解明の一助となる可能性がある。ppIL-1 α の細胞外機能に関する検討は、今後も継続する必要があるものと考えられた。