

論文審査の結果の要旨

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 propiece interleukin-1 α の機能比較

審査委員：（主 査） 教授 磯 川 桂太郎

（副 査） 教授 白 川 哲 夫

教授 浅 野 正 岳

教授 武 市 収

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細胞外へ放出する物質は、danger-associated molecular patterns または alarmin と総称される。alarmin の一種である IL-1 α は、分子量約 34 kDa の前駆体（precursor IL-1 α ; pIL-1 α ）として細胞内で産生され、Ca²⁺依存性の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 などによって酵素的に切断された後、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 ）を生じる。3 種の IL-1 α 関連分子のうち、nuclear localizing sequence を有するため核内に局在するとされる ppIL-1 α の機能を追究した研究は多くない。しかし、先行研究では、肺腺癌由来株化細胞（A549 細胞）において、pIL-1 α および mIL-1 α 刺激が IL-6 と IL-8 の産生を誘導することが報告されている。

そこで本研究では、*in vitro* transcription/translation 法を用いて、recombinant の mIL-1 α （rmIL-1 α ）と、同じく recombinant である ppIL-1 α （rppIL-1 α ）を作製し、A549 細胞を用いた bioassay によって ppIL-1 α の生物学的機能の検討を行った。rmIL-1 α と rppIL-1 α の作製に先立って、ベクターの形状差異が recombinant タンパク質産生量の変化に及ぼす影響を調べた。すなわち、mIL-1 α の発現ベクターである pcDNA-mIL-1 α を制限酵素 Xho I で直鎖化したものと、環状構造のままのものをそれぞれ *in vitro* transcription/translation 法に供した。生成された反応産物の分子量については western blot 法で確認し、産生量については enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法にて定量した。特異抗体が unavailable であるために、ELISA 法による定量を実施できなかった rppIL-1 α 分子については、同分子と段階希釈した既知量のアルブミンを同時に電気泳動し、染色バンドの濃度を基に半定量を試みた。得られた rmIL-1 α と rppIL-1 α の生物学的活性については、これらを培養下の A549 細胞に添加・刺激して、IL-6 と IL-8 の産生量を ELISA 法にて評価することで検討した。

その結果、*in vitro* transcription/translation 法によって作製した rmIL-1 α 及び rppIL-1 α について、以下の結論を得た。

1. *In vitro* transcription/translation 法による recombinant タンパク質の産生について、環状あるいは直鎖状というベクターの形状には影響を受けなかった。
2. 得られた rmIL-1 α 及び rppIL-1 α は、それぞれ 19 kDa 及び 18 kDa の単一バンドとして検出された。
3. ヒト肺腺癌由来の A549 細胞に対する rmIL-1 α 刺激は、IL-6 及び IL-8 産生を濃度依存的に誘導した。
4. A549 細胞において rppIL-1 α 刺激は IL-8 の産生誘導を惹起しなかった。

以上のように、*in vitro* transcription/translation 法によって得られた rmIL-1 α 及び rppIL-1 α は、IL-1 α 関連分子の生理活性と機能分析のための培養実験に供することができるほか、特異抗体の作製における免疫原としても活用が可能と考えられ、IL-1 α の機能解明に寄与するものと考えられた。

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 1 0 日