

論文の内容の要旨

氏名：工 藤 圭 紘

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Nuclear localization status of propeptide interleukin (IL)-1 α in HeLa cells
(HeLa 細胞における propeptide IL-1 α の存在様式)

外傷や代謝障害などによりダメージを受けた細胞・組織は壊死に陥るが、この際、周囲組織には炎症が生じる。これは、sterile inflammation と呼ばれ、病原微生物の感染なしに生じる炎症であり、壊死した細胞から放出された因子により惹起されると考えられている。こうした物質は、danger-associated molecular patterns (DAMPs) または alarmin と総称され、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という機能を担っている。従って、alarmin は、平常状態においては細胞の中に存在し、壊死に際して細胞外に放出される。代表的な alarmin として、IL-33 や high-mobility group box-1 (HMGB1) などがあるが、本研究においては IL-1 α に着目した。

IL-1 α は約 34 kDa の前駆体 (precursor IL-1 α ; pIL-1 α) として細胞質内で産生される。その後、Ca²⁺依存性セリンプロテアーゼカルパインや好中球などが持つ granzyme B (GzmB) などにより分子のほぼ中央部分を切断される。この結果、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) が産生される。mIL-1 α は、細胞外に分泌され、特異的レセプターである IL-1 receptor type I (IL-1R1) に結合し、IL-6 や IL-8 などの産生を促すことによって炎症カスケードを起動する。一方、ppIL-1 α および pIL-1 α は、nuclear localizing signal (NLS) を有しており、このため、主に核内に局在するとされている。本研究では、これら IL-1 α 3 分子種の細胞内局在や、その局在様式について検討することとした。

実験には、ヒト子宮癌由来培養線維芽細胞である HeLa 細胞を用いた。細胞の培養は、10%ウシ胎児血清加 Dulbecco's minimum essential medium (10% FCS-DMEM) を用い、5% CO₂ インキュベーターにより培養した。佐田らにより作成された pcDNA-pIL-1 α 発現プラスミドを鋳型として、それぞれの分子の N 末端に green fluorescence protein (GFP) 配列を付加した。HeLa 細胞への transfection は Lipofectamine LTX 試薬と、OPTI-MEM 培地を用いて行った。ppIL-1 α の NLS 欠失変異体 (Δ NLS) は、Quick-Change site-directed mutagenesis kit と GFP-ppIL-1 α ベクターを鋳型として作製した。HeLa 細胞は、カバースリップに播種した後、GFP-pIL-1 α 、GFP-mIL-1 α 、GFP-ppIL-1 α を transfection した。18 時間後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、2% パラホルムアルデヒドで固定を行い、その後 IL-1 α 分子の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した。 Δ NLS の細胞内局在についても同様の方法で観察した。IL-1 α の核局在は、GFP-pIL-1 α または GFP-ppIL-1 α とヒストン H2B を mCherry でタグ付けした H2B mCherry 発現ベクターを、HeLa 細胞に共導入し調べた。未固定の transfectant は、氷上で 5 分間 0.1% Triton X-100/PBS solution で処理した。その後、細胞を 37°C に加温した PBS で洗浄し、2% パラホルムアルデヒドで固定して観察した。N 末端に HiBiT タグを付与した IL-1 α ベクターを作製し、48 well プレートに播種した HeLa 細胞 (1×10^4 /well) に transfection した。この細胞を、10 mM 過酸化水素水溶液 (H₂O₂) の存在下または非存在下で 3 時間培養し、酸化ストレスを加えた。その後、培養上清と細胞溶解液を採取し、HiBiT の発現量を [培養上清 / (培養上清 + 細胞溶解) \times 100(%)] で算出した。HiBiT の発現量は、Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System を用いて定量化し、ルシフェラーゼ活性の測定には、GloMax 20/20 Luminometer を用いた。さらに、採取した培養上清と細胞溶解液は、DuoSet ELISA Development System を用いて、IL-1 α の enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定した。

その結果、mIL-1 α は細胞質にびまん性に局在したが、pIL-1 α と ppIL-1 α は核に局在していることが確認できた。また、3 種類の IL-1 α は定常状態でも細胞から放出され、放出効率率は mIL-1 α 、pIL-1 α 、ppIL-1 α でそれぞれ約 25%、13%、8%であった。さらに、酸化ストレス条件下におけるそれぞれの細胞内局在の変化について検討したところ、GFP-mIL-1 α の核の蛍光は完全に消失したのに対し、GFP-pIL-1 α と GFP-ppIL-1 α は弱い蛍光が核に残存していた。GFP-ppIL-1 α の核内局在の様式について検討するために、transfectant を 0.1% Triton X-100 により処理した。その結果、GFP-ppIL-1 α の蛍光は、完全に消失した。一方、GFP-ppIL-1 α transfectant を培養液中で氷上 10 分間反応させたところ、

GFP-ppIL-1 α の核局在に変化はなかった。エネルギー非依存性の核移行においては、同様の処理により核局在は完全に消失することが知られていることから、これらの結果は、ppIL-1 α がエネルギー依存性に核に集積することを示していた。

本研究の結果から、3 種類の IL-1 α 分子はすべて効率の差はあるものの、定常状態においても細胞外に放出されていることが明らかとなった。また、ppIL-1 α は、エネルギー依存性に核に集積するものの、その局在は染色体 DNA や核タンパク質と強固に結合しているわけではなく、比較的緩やかに核質中に浮遊している可能性が示唆された。