

## 論文の内容の要旨

氏名：石 山 雄 一

博士の専攻分野の名称：博士 (歯学)

論文題名：Propiece IL-1 $\alpha$  の核内への輸送機構と核内機能

Alarmin は損傷した細胞から放出される分子であり、周囲の組織に炎症反応を誘導し、生体の自然免疫系や獲得免疫系を活性化する警告信号として機能している。Interleukin (IL)-1 $\alpha$  は、細胞が低酸素状態、酸化ストレス、熱刺激などに晒されたときに放出される代表的な alarmin であり、血管新生や創傷治癒など様々な反応に関与している。IL-1 $\alpha$  は細胞質で 31 kDa の precursor IL-1 $\alpha$  (pIL-1 $\alpha$ ) として産生された後、calpain, granzyme B, thrombin などの酵素によって切断される。酵素切断の結果、N 末端の propiece IL-1 $\alpha$  (ppIL-1 $\alpha$ ) と C 末端の mature IL-1 $\alpha$  (mIL-1 $\alpha$ ) が生成される。pIL-1 $\alpha$  と mIL-1 $\alpha$  は細胞外に分泌され、IL-1 receptor type I を介してシグナル伝達し機能を発揮する。さらに、pIL-1 $\alpha$  と ppIL-1 $\alpha$  は核局在配列 (NLS) の存在により核に輸送され、標的遺伝子の転写制御に寄与するとされている。また、pIL-1 $\alpha$  は核クロマチンや他の核内タンパク質に結合することが報告されている。しかしながら、ppIL-1 $\alpha$  の核内輸送のメカニズムや核内機能は明らかにされていない。

そこで本研究では、ppIL-1 $\alpha$  の核内輸送メカニズムの解明を目指すとともに、核内における遺伝子発現への関与について検討した。

実験にはヒト子宮癌由来線維芽細胞である HeLa 細胞を用いた。細胞の培養は 10%ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium にペニシリン・ストレプトマイシンを添加したものを用い、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。3 種類の IL-1 $\alpha$  分子の細胞内局在を検索するために、Sata らによって構築されたヒト IL-1 $\alpha$  発現 plasmid を鋳型として、3 種類の IL-1 $\alpha$  を PCR によって増幅し、pEGFP vector にサブクローニングした。それぞれの plasmid を GFP-pIL-1 $\alpha$ , GFP-mIL-1 $\alpha$  および GFP-ppIL-1 $\alpha$  とした。Transfection 実験は Lipofectamine 3000 を用いて行った。24-well plate に直径 10 mm の cover slip を入れ、HeLa 細胞を 5 $\times$ 10<sup>4</sup>/well で播種し、18 時間培養した。それぞれの plasmid を transfection した後、細胞を phosphate buffer saline (PBS) により洗浄して、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 による洗浄後、DAPI-fluoromount-G を用いて封入し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。さらに、ppIL-1 $\alpha$  を transfection した HeLa 細胞から細胞溶解液を回収し、核抽出液を NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents で調整した。抽出液を 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によって分離し、Western Blotting (WB) を行った。GFP ( $\times$  10,000) および Lamin B に対する抗体 ( $\times$  1,000) を 1% BSA diluted in 0.1% Tween-20/PBS で希釈し一次抗体として用いた。二次抗体は、それぞれ horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 抗体および HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体を使用した。エネルギー依存性の ppIL-1 $\alpha$  核内輸送を調べるために、cover slip 上に播種した細胞に transfection を行い、その後 importin  $\beta$  の阻害薬である importazole (10 nM) 存在下または非存在下で 6 時間培養後、蛍光顕微鏡で観察した。また、ppIL-1 $\alpha$  の核内における IL-8 遺伝子発現への関与については、pcDNA (control) または pcDNA-ppIL-1 $\alpha$  を細胞に transfection し、18 時間後に total RNA を精製し、相補的 DNA を合成して、real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) で確認した。

GFP-mIL-1 $\alpha$  transfectant において、蛍光は細胞質にびまん性に観察されたのに対して、GFP-pIL-1 $\alpha$  および GFP-ppIL-1 $\alpha$  transfectant では主に核内に蛍光が局在していた。GFP-ppIL-1 $\alpha$  transfectant から核抽出液を調整し、WB により検討したところ、ppIL-1 $\alpha$  のバンドが検出され、ppIL-1 $\alpha$  は主に核内に局在することが確認された。ppIL-1 $\alpha$  の核への局在が、エネルギー依存性であるか否かを検討するため、importin  $\beta$  阻害薬である importazole 存在下で ppIL-1 $\alpha$  transfectant を培養したところ、GFP-ppIL-1 $\alpha$  の核内局在には何ら変化が認められなかった。また、ppIL-1 $\alpha$  transfectant においては、IL-8 mRNA 発現が、control と比較して、8.9 $\pm$ 0.91 倍に増加していた。

以上の結果から、mIL-1 $\alpha$  は細胞質にびまん性に分布するのに対し、pIL-1 $\alpha$  と ppIL-1 $\alpha$  は主に核に局在することが確認された。ppIL-1 $\alpha$  の核への輸送は、importin  $\beta$  の阻害には影響されなかったことから、importin  $\beta$  は ppIL-1 $\alpha$  の核輸送には関与しない可能性が考えられた。さらに、ppIL-1 $\alpha$  transfectant では、

IL-8 mRNA の発現が増強されていたことから, ppIL-1 $\alpha$  が何らかの方法で遺伝子発現に関与している可能性が示唆された。

以上のことから, ppIL-1 $\alpha$  は, importin  $\beta$  に依存しない未知のメカニズムによって核に集積する可能性が考えられた。また, ppIL-1 $\alpha$  は核内において, IL-8 の発現増加を介して炎症に関与していることが示唆された。