

## 論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主 査） 教授 鈴 木 直 人

（副 査） 教授 浅 野 正 岳

教授 川 戸 貴 行

教授 篠 田 雅 路

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 $\alpha$  は細胞質で分子量 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。

3 種類の IL-1 $\alpha$  (pIL-1 $\alpha$ , mIL-1 $\alpha$  および ppIL-1 $\alpha$ ) の N 末端に green fluorescence protein を結合した発現プラスミドを構築し、ヒト子宮癌由来の培養細胞 HeLa に transfection した。こうして作製された細胞を transfectant とした。Transfectant の細胞溶解液を回収し、Western Blotting (WB) により、それぞれのタンパク質発現を確認するとともに、蛍光顕微鏡で観察し、IL-1 $\alpha$  の細胞内局在について検討した。ppIL-1 $\alpha$  transfectant からは核抽出液を調整し、WB により核における局在についてさらに検討を加えた。また、ppIL-1 $\alpha$  の核内輸送がエネルギー依存性であるか否かを調べるために、エネルギー依存的核輸送に必須とされる importin  $\beta$  の阻害薬である 10 nM importazole 存在下および非存在下で ppIL-1 $\alpha$  transfectant を培養し、その細胞内局在について観察した。ppIL-1 $\alpha$  は、核において IL-8 遺伝子発現を増強することが報告されている。そこで、HeLa においても ppIL-1 $\alpha$  の強制発現が IL-8 の遺伝子発現を増強させるか real-time PCR により検討した。

その結果、以下の結論を得ている。

1. 細胞内で、mIL-1 $\alpha$  は細胞質に拡散して分布し、pIL-1 $\alpha$  と ppIL-1 $\alpha$  は主に核に局在した。
2. ppIL-1 $\alpha$  の核局在は、エネルギー依存性であったが、importin  $\beta$  には依存しなかった。
3. ppIL-1 $\alpha$  は IL-8 遺伝子発現に転写レベルで関与していた。

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 $\alpha$  が核内において、IL-8 遺伝子発現を転写レベルで増強させており、このことは、IL-8 分泌を促進することで炎症反応または血管新生に関与していることを示唆するものであった。本研究の結果は、核内における ppIL-1 $\alpha$  の新たな機能解明につながる可能性を示唆するものであり、炎症ならびに関連する歯科医学の分野に寄与するところが大きいものと考えられた。

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 5 年 3 月 9 日