

Proiece IL-1 α の核内への輸送機構と核内機能

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

石 山 雄 一

(指導：浅 野 正 岳 教授、角 田 麻里子 助教)

緒言

Alarmin は損傷した細胞から放出される分子であり¹⁾、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 α は、細胞が低酸素状態、酸化ストレスや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²⁾、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 α は細胞質で 31 kDa の precursor IL-1 α (pIL-1 α) として産生された後、Ca²⁺依存性タンパク質分解酵素³⁻⁵⁾、granzyme B⁶⁾ や thrombin⁷⁾ 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 propeptide IL-1 α (ppIL-1 α) と C 末端の mature IL-1 α (mIL-1 α) が生成される (図 1)^{8,9)}。pIL-1 α と mIL-1 α 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¹⁰⁾。さらに、pIL-1 α と ppIL-1 α は核局在配列 (NLS) の存在により核に輸送され¹¹⁾、標的遺伝子の転写制御に寄与するとされている^{8,12)}。また、pIL-1 α は核クロマチン¹³⁾ 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^{14,15)}。しかしながら、ppIL-1 α の核内輸送のメカニズムや核内機能は完全には解明されていない。そこで、本研究では、ppIL-1 α 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。

材料および方法

1. 細胞

ヒト子宮癌由来の線維芽細胞 (HeLa 細胞) は医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 生物資源バンク (大阪) から入手した。細胞は、10%ウシ胎児血清 (FCS), 50 μ g/ml ストレプトマイシン, 50 U/ml ペニシリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加した Dulbecco' Modified Eagle's Medium (DMEM) で 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。

2. プラスミド構築

3 種類の IL-1 α の DNA テンプレートおよび pcDNA-ppIL-1 α ベクターは Sata ら¹⁶⁾の方法を用いて作製した。各 IL-1 α は pEGFP-C3 ベクター (Clontech, San Jose, CA, USA) に挿入し, N 末端の緑色蛍光タンパク質 (GFP) タグに融合した (GFP-pIL-1 α , GFP-mIL-1 α , GFP-ppIL-1 α ベクター)(図 2)。Transfection のために, 各プラスミド (250 ng) と Plus 試薬 (0.75 μ l) および Lipofectamin 3000 (0.75 μ l) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を, それぞれ 25 μ l OPTI-MEM (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) に溶解した。両溶液を混合し, 室温で 15 分間反応させた後, 培養液に添加し 37°C で 18 時間培養した。以上のように処理した細胞を transfectant として, その後の実験に供した。

3. cover slip 実験

HeLa 細胞 (5 \times 10⁴ / well) を 24 well プレートに入れた cover slip (直径 10 mm : 松波硝子工業, 東京) 上に播種した。37°C, 18 時間培養後, 上記方法によって GFP-pIL-1 α , GFP-mIL-1 α , GFP-ppIL-1 α を transfection した。細胞を 37°C に加温したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し, 4%パラホルムアルデヒドで固定した。さらに PBS で洗浄

後, DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) を用いて cover slip をスライドガラスに封入した。観察および画像の撮影には, オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X810, キーエンス, 大阪) を使用した。また, エネルギー依存性の ppIL-1 α 核内輸送の有無を調べるために, importin β の阻害薬である importazole (10 nM, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)の存在下または非存在下で 37°C, 6 時間培養し, 観察を行った。

4. real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

HeLa 細胞 (1×10^5 / 48 well plate) に, pcDNA または pcDNA-ppIL-1 α を transfection した。18 時間後, RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を精製した。相補的 DNA は, Superscript III 逆転写酵素 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) を用いて合成した。real-time PCR は, CFX 96 real-time system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ, 草津) を用いて行った。本研究で使用したプライマーを表 1 に示す。pcDNA transfectant および ppIL-1 transfectant における IL-8 の遺伝子発現を内在性コントロール (β -actin) に対する比として $\Delta \Delta CT$ 法で算出した。前者の値を 1 とした時の, これに対する ppIL-1 α transfectant における遺伝子の増幅量をデータとして示した。

5. ウェスタンブロッティング (WB)

作製した transfectant を PBS で 2 回洗浄し, 500 μ l の細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) を用いて溶解させた。BioRad protein assay kit (Bio-Rad) を用いて総タンパク濃度を測定し, 40 ng のタンパクを 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel を用いて電気泳動した。WB は Omagari ら¹⁷⁾の方法に従っ

て行った。一次抗体として、マウス抗 GFP 抗体 (Proteintech, Rosemont, IL, USA; $\times 10,000$) を 1% BSA diluted in 0.1% Tween-20/PBS (1% BSA-PBST) で希釈し、室温で 1 時間反応させた。二次抗体として、horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA; $\times 8,000$) を用い、室温で 1 時間反応させた。なお、核抽出液は NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific) で精製し、WB に供した。核の内在性コントロールには Lamin B を用いた。一次抗体としてウサギ抗ヒト Lamin B 抗体 (Proteintech; $\times 1,000$) および二次抗体として HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch; $\times 6,000$) を使用した。

6. 統計学的解析

統計解析は、正規性を Shapiro-Wilk 検定、等分散性を Levene 検定で確認した後に Student's *t*-test を用いた。結果は、平均値 \pm 標準偏差で表した。0.05 未満の *p* 値は統計的に有意であるとみなした。

結果

1. IL-1 α の細胞内局在

GFP-pIL-1 α , GFP-ppIL-1 α , GFP-mIL-1 α の 3 種類 (図 2A) の分子の発現について WB で確認したところ, GFP-pIL-1 α は 60 kDa, GFP-mIL-1 α は 43 kDa, GFP-ppIL-1 α は 42 kDa の単一のバンドとして検出された (図 2B)。次に, IL-1 α 分子の細胞内局在について検索した。その結果, mIL-1 α は細胞質にびまん性に分布し, pIL-1 α と ppIL-1 α は主に核に局在していた (図 3A)。この結果を確認するために, transfectant から核抽出液を調整し WB により検討したところ, ppIL-1 α のバンドが検出された (図 3B)。

2. ppIL-1 α の核への輸送

ppIL-1 α の核への局在は, 核と細胞質との間の受動拡散によるものではないことが Kudo ら¹⁸⁾ により確認されている。そこで、エネルギー依存的核輸送に必須の importin β の関与について, importin β 阻害薬である importazole の存在下および非存在下で ppIL-1 α transfectant を培養することにより確認した。その結果, 核における ppIL-1 α の局在には何ら変化が認められなかった (図 4)。

3. ppIL-1 α による IL-8 mRNA の発現増強

ppIL-1 α 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¹⁹⁾。そこで, HeLa 細胞においても ppIL-1 α の強制発現が IL-8 mRNA 発現を増強させるかという点について検討した。その結果, IL-8 mRNA 発現レベルは, ppIL-1 α の組み込まれていない pcDNA transfectant に比べて ppIL-1 α transfectant で 8.9 ± 0.91 倍に増加していた (図 5)。

考察

GFP タグ付き IL-1 α 発現ベクターを用いた本研究では, mIL-1 α は細胞質にびまん性に分布し, pIL-1 α と ppIL-1 α は主に核に局在することが確認された。これまでの研究から, pIL-1 α の N 末端および C 末端へのタグの付与は, その機能に何ら影響を及ぼさないことが報告されており¹²⁾, これら分子の核局在は, 従来の報告と一致するものであった。また, これらの分子の核局在には, NLS が極めて重要であり, NLS を欠失させることにより細胞質への移行を促すことが知られている¹⁸⁾。NLS は, importin α または importin β などの核移行を担う分子によって認識される配列であり²⁰⁾, IL-1 α が NLS を有していること自体がエネルギー依存性に核移行することを示唆している。しかし, IL-1 α の核内輸送のメカニズムについては Luheshi ら²¹⁾ の報告があるのみで, 低分子量 G タンパク質である Ran に依存する核内輸送とされている。そこで, importin β の阻害薬である importazole 存在下での ppIL-1 α transfectant の培養は ppIL-1 α の核局在に変化を及ぼすものと予測した。しかし本研究の結果, ppIL-1 α が NLS を有しながらも, importazole による影響を受けなかったことから, ppIL-1 α の核局在は importin β 非依存性であることが示唆された。これまで importin α は, 核内輸送される分子と importin β との結合を仲介するアダプター分子と考えられてきたが²⁰⁾, 近年の研究で, importin α のみによって核内輸送される機構があることが判明している²²⁾。当研究室のこれまでの実験で, pIL-1 α が importin α と結合することを免疫沈降実験により確認している。また, IL-1 α 分子内に存在する NLS 配列を, 細胞膜を通過できない分子に融合させると, この分子が脂質 2 重膜を通過することが知られている²³⁾。従って, NLS を欠失した IL-1 α を細胞に transfection することにより発現させた細胞では, IL-

1 α が脂質 2 重膜である核膜を通過できずに細胞質に拡散した結果である可能性も考えられる。ppIL-1 α の核内への輸送については今後さらに検討を加える必要がある。

一方、核に輸送された ppIL-1 α は、どのようなメカニズムで核局在しているのだろうか。ppIL-1 α に結合する分子としては、これまでに HAX-1 や Necdin などが報告されている^{14, 15)}。この中で、アポトーシスに関連する分子としての HAX-1 は、pIL-1 α の N 末端側に結合部位が存在するとされている¹⁴⁾。しかし、細胞内局在や機能が多様であることから、pIL-1 α の核局在に果たす役割については未だ不明である。マウスのマクロファージでは、pIL-1 α が核クロマチンに結合しているとの報告もあるが¹³⁾、ヒトにおいてはこの事実は確認されていない。pIL-1 α は、細胞膜貫通タンパク質や分泌タンパク質が有するシグナルペプチドを欠いており²⁴⁾、一般的なタンパク質の産生ルートである小胞体—ゴルジ体輸送を経由しないとされている。従って、細胞外への分泌メカニズムも解決されておらず、多くの疑問点が残されている。

ppL-1 α は、様々なタンパク質の遺伝子発現に寄与していることが示されている¹²⁾。なかでも、IL-8 遺伝子の発現に対する機能は着目されている。これは IL-8 が、炎症増悪とともに、血管新生など創傷治癒にも寄与するなど多彩な機能を有するためである²⁵⁾。本研究によって、線維芽細胞である HeLa 細胞においても、ppIL-1 α の過剰発現が IL-8 mRNA の発現を増大させることが明らかとなった。このことは、ppIL-1 α が IL-8 遺伝子発現を転写レベルで増強させ、その分泌を促進し、炎症反応または血管新生反応を拡大していく機能を有するものと考えられた。

本研究の結果、ppIL-1 α の核への輸送は importin β 非依存性であり、核内では、IL-8 などの遺伝子発現に転写レベルで関与している可能性が示唆された。

結論

本研究では、3 種類の IL-1 α (pIL-1 α , mIL-1 α および ppIL-1 α) を HeLa 細胞に transfection することで、各 IL-1 α の細胞内における局在および ppIL-1 α の核内輸送や核内機能について検討した。その結果、以下の知見を得た。

1. 細胞内で、mIL-1 α は細胞質に拡散的に分布し、pIL-1 α と ppIL-1 α は主に核に局在した。
2. ppIL-1 α の核局在は、importin β に依存しなかった。
3. ppIL-1 α は IL-8 遺伝子発現に転写レベルで関与していた。

以上の結果から、ppIL-1 α は核内において、IL-8 の発現増強を介して、炎症反応を拡大することが示唆された。

文献

- 1) Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17, 359-365.
- 2) Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, White RM, Dinarello ACh, Apte N R (2011) IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol* 187, 4835-4843.
- 3) Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K (1990) Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5548-5552.
- 4) Carruth LM, Demczuk S, Mizel SB (1991) Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 α precursor. *J Biol Chem* 266, 12162-12167.
- 5) England H, Summersgill HR, Edye ME, Rothwell NJ, Brough D (2014) Release of interleukin-1 α or interleukin-1 β depends on mechanism of cell death. *J Biol Chem* 289, 15942-15950.
- 6) Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP, Bots M, Lüthi AU, Reeves EP, McElvaney NG, Medema JP, Lavelle EC, Martin SJ (2011) Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1 α . *Mol Cell* 44, 265-278.
- 7) Burzynski LC, Humphry M, Pyrillou K, Wiggins KM, Chan JNE, Figg N, Kitt LL, Summers C, Taham KC, Martin PB, Bennett MR, Clarke MCH (2019) The coagulation and immune systems are directly linked through the activation of interleukin-1 α by thrombin. *Immunity* 50, 1033-1042.

- 8) Stevenson FT, Turck J, Locksley RM, Lovett DH (1997) The N-terminal propiece of interleukin 1 α is a transforming nuclear oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 508-513.
- 9) Afonina IS, Müller C, Martin SJ, Beyaert R (2015) Proteolytic processing of interleukin-1 family cytokines: variations on a common theme. *Immunity* 42, 991-1004.
- 10) Kim B, Lee Y, Kim E, Kwak A, Ryoo S, Bae SH, Azam T, Kim S, Dinarello CA (2013) The interleukin-1 α precursor is biologically active and is likely a key alarmin in the IL-1 family of cytokines. *Front Immunol* 4, 391.
- 11) Di Paolo NC, Shayakhmetov DM (2016) Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol* 17, 906-913.
- 12) Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello AC, Apte NR (2004) The precursor form of IL-1 α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2434-2439.
- 13) Lamacchia C, Rodriguez E, Palmer G, Gabay C (2013) Endogenous IL-1 α is a chromatin-associated protein in mouse macrophages. *Cytokine* 63, 135-144.
- 14) Yin H, Morioka H, Towle CA, Vidal M, Watanabe T, Weissbach L (2001) Evidence that HAX-1 is an interleukin-1 alpha N-terminal binding protein. *Cytokine* 15, 122-137.
- 15) Hu B, Wang S, Zhang Y, Feghali CA, Dingman JR, Wright TM (2003) A nuclear target for interleukin-1 α : interaction with the growth suppressor p53 modulates proliferation and collagen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10008-10013.
- 16) Sata E, Takada L, Kaetsu R, Fukasawa M, Ohtsu M, Motoyoshi M, Asano M (2020) A new enzyme-linked immunosorbent assay system against the N-terminal propiece of

- interleukin-1 α . J Oral Sci 62, 340-343.
- 17) Omagari D, Mikami Y, Suguro H, Sunagawa K, Asano M, Sanuki E, Moro I, Komiyama K (2009) Poly I:C-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 in intestinal epithelial cells. Clin Exp Immunol 156, 294-302.
 - 18) Kudo Y, Tamagawa T, Nishio K, Kaneko T, Yonehara Y, Tsunoda M (2022) Nuclear localization of propiece IL-1 α in HeLa cells. J Oral Sci 64, 151-155.
 - 19) Yang HT, Cohen P, Rousseau S (2008) IL-1 β -stimulated activation of ERK1/2 and p38 α MAPK mediates the transcriptional up-regulation of IL-6, IL-8 and GRO- α in HeLa cells. Cell Signal 20, 375-380.
 - 20) Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP (2007) Nucleocytoplasmic transport of proteins. Biochemistry (Mosc) 72, 1439-1457.
 - 21) Luheshi NM, Rothwell NJ, Brough D (2009) The dynamics and mechanisms of interleukin-1 α and β nuclear import. Traffic 10, 16-25.
 - 22) Ogawa Y, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y (2012) The interaction between importin- α and Nup153 promotes importin- α / β -mediated nuclear import. Traffic 13, 934-946.
 - 23) Koo JH, Yoon H, Kim WJ, Lim S, Park HJ, Choi JM (2014) Cell membrane penetrating function of the nuclear localization sequence in human cytokine IL-1 α . Mol Biol Rep 41, 8117-8126.
 - 24) Monteleone M, Stow JL, Schroder K (2015) Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. Cytokine 74, 213-218.
 - 25) Fousek K, Horn LA, Palena C (2021) Interleukin-8: A chemokine at the intersection of

cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression. *Pharmacol Ther* 219, 107692.

図および表

表 1 プライマーの配列

Target gene	Oligonucleotide sequence	Genbank acc. no.
IL-8	Forward: 5' - ATGACTTCCAAGCTGGCC - 3'	NM_000584.4
	Reverse: 5' - CTTCTCCACAACCCTCTGC - 3'	
β - Actin	Forward: 5' - GGAGCAAGTATCTTGATCTTC - 3'	NM_007393
	Reverse: 5' - CCTTCCTGCGCATGGAGTCCTG - 3'	

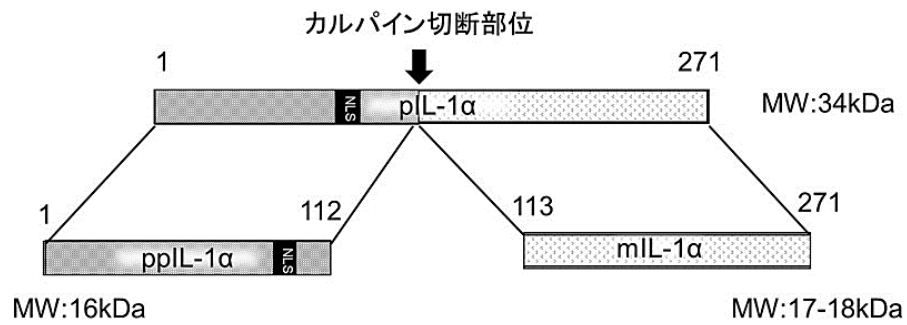


図 1. IL-1 α の構造

IL-1 α は前駆体 IL-1 α (pIL-1 α) として細胞内で産生される (1-271)。pIL-1 α は酵素的に切断されて ppIL-1 α (N 末端 1-112) と mL-1 α (C 末端 113-271) が生成される。核局在配列 (NLS) は 79-86 に位置する。数字はアミノ酸の位置を示す。

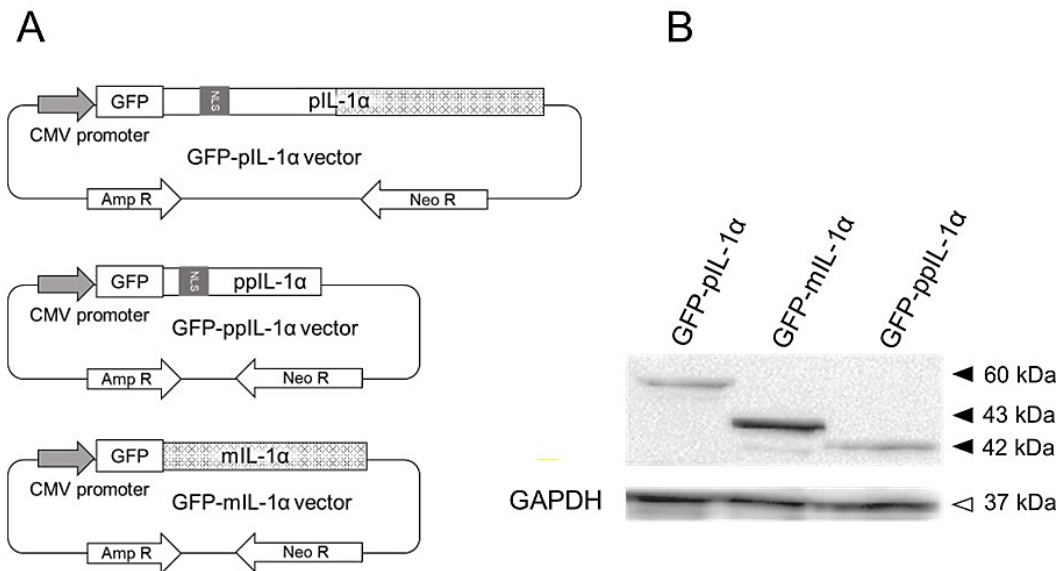


図 2. 実験に使用した発現ベクターと transfectant におけるそれぞれの発現

(A) 3 種類の IL-1 α の DNA 断片を pEGFP-C3 ベクターにライゲーションして GFP と融合させた。(B) それぞれのベクターによる transfectant から, 細胞溶解液を回収して, WB でタンパク質発現を確認した。

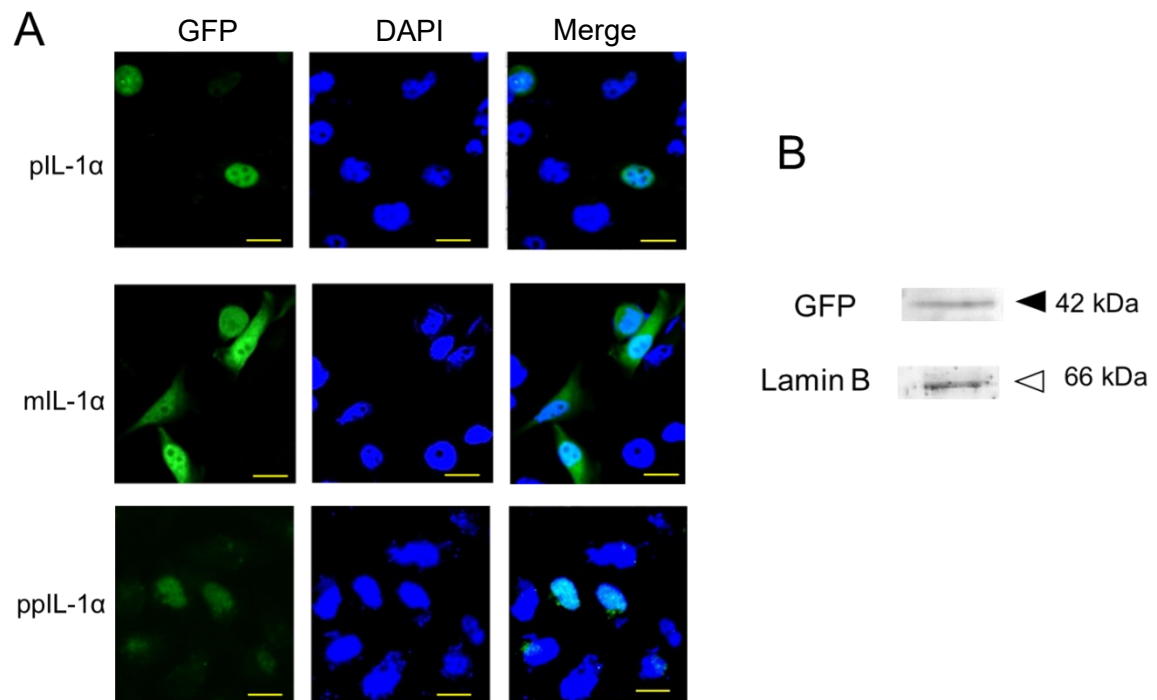


図 3. IL-1 α の細胞内局在

(A) HeLa 細胞に GFP-pIL-1 α , GFP-mIL-1 α , および GFP-ppIL-1 を transfection した。

transfection 後, 細胞を蛍光顕微鏡で観察した。核は DAPI で染色した (scale bar : 10

μm)。 (B) GFP-ppIL-1 α transfectant から核抽出液を調製し, WB に供した。核内部コン

トロールとして Lamin B を用いた。

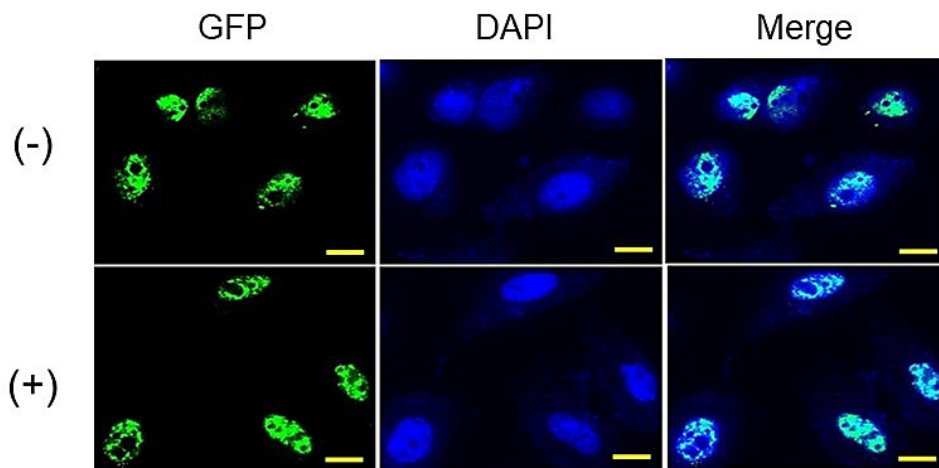


図 4. ppIL-1 α の核への輸送

GFP-ppIL-1 α transfectant を， importin β 阻害薬である importazole (10 nM) 存在下 (+ : 下段) または非存在下 (- : 上段) で 6 時間培養した (scale bar : 10 μ m)。その後，細胞内 GFP-ppIL-1 α の局在変化を蛍光顕微鏡で観察した。

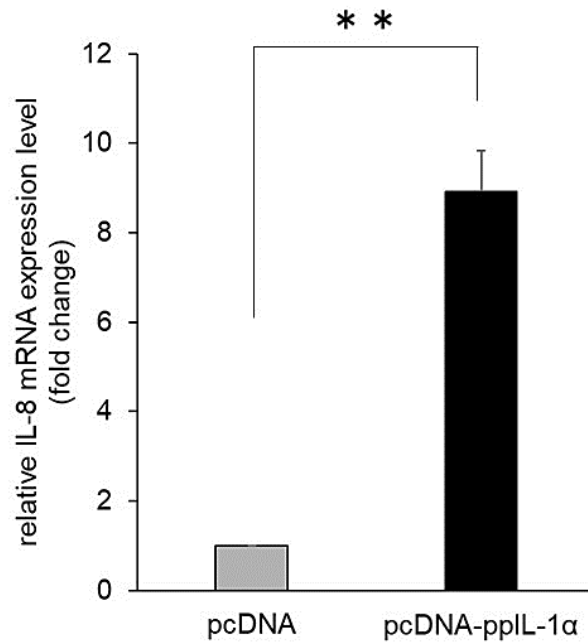


図 5 ppIL-1 α による IL-8 mRNA の発現増強

HeLa 細胞に pcDNA (control) または pcDNA-ppIL-1 α ベクターを transfection し, 18 時間培養した。その後, total RNA を精製し, real-time PCR により IL-8 mRNA の発現量を測定した。内在性コントロール (β -actin) の発現量を 1 として, これに対する ppIL-1 α transfectant における IL-8 発現量を比で表した。プライマー配列を表 1 に示した。

** $p < 0.01$ (n = 5)。