

IL-1 receptor type 2 による細胞内 pIL-1 α の細胞外分泌抑制

定村 正之

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

(指導：浅野正岳教授)

緒言

細胞が障害を受けたときに放出される分子は **alarmin** と総称される¹⁾。 **Interleukin-1 α** (**IL-1 α**) は代表的な **alarmin** として知られている。 **IL-1 α** は細胞内で約 31 kDa の前駆体 precursor **IL-1 α** (**pIL-1 α**) として産生され、 **calpain** や **granzyme B** などの酵素によって propeptide (**pp**) **IL-1 α** と mature (**m**) **IL-1 α** に切断される (図 1)²⁾。

IL-1 α の主要な受容体サブユニットとして、 **interleukin-1 receptor type 1 (IL-1R1)** と **type 2 (IL-1R2)** が知られている。 **IL-1R1** はシグナルを伝達できるのに対し、シグナル伝達に必須の配列である **Toll/IL-1 Receptor (TIR)** ドメインを欠く **IL-1R2** はシグナル伝達できない。このことから、**IL-1R2** は **decoy receptor** と呼ばれている³⁾。 **IL-1R2** は、**IL-1 α** および **IL-1 β** と直接結合することでシグナル伝達を阻止するだけでなく、 **IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP)** とも複合体を形成し、 **IL-1 α** 結合に伴うシグナル伝達を抑制する^{3,4)}。 **IL-1R2** ノックアウトマウスの解析から、 **IL-1R2** の上記のような **decoy receptor** としての特性はマクロファージにおいて機能していることが明らかとなっているが、マクロファージ以外の細胞における **IL-1R2** の機能は未だ不明な点が多い⁴⁾。

Zheng ら⁵⁾は、 **IL-1R2** は細胞膜上または細胞外で **decoy receptor** として機能しているだけでなく、細胞質内で **pIL-1 α** と結合して **pIL-1 α** の細胞外分泌を阻害することにより、無菌性炎症を抑制することを報告した。また、リポポリサッカライド (**LPS**) 刺激による **caspase** 活性化を介した細胞質内の **IL-1R2** 分解は、 **pIL-1 α** と **IL-1R2** との結合を切断して **pIL-1 α** の細胞外分泌を促進するとも報告している⁵⁾。本研究では、ヒト子宮頸癌由来線維芽細胞である **HeLa** 細胞に **IL-1R2** と **pIL-1 α** を強制発現させ、同様

に pIL-1 α の細胞外分泌抑制が起きるのかという点について検討を行った。また, IL-1R2 の細胞膜貫通領域の pIL-1 α 細胞外分泌に対する役割についても解析した。

材料および方法

1. 細胞

本研究には、ヒト子宮頸癌由来線維芽細胞である HeLa 細胞 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク, 大阪) を用いた。培養は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に 10% ウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific) および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) を添加したものをを用い、インキュベータ (37°C, 5% CO₂) で行った。HeLa 細胞を 24-well plate に 5×10⁴ cells/well となるように播種した。

2. Plasmid の構築と transfection

HeLa 細胞への IL-1R2 の強制発現には、pCMV-SPORT 6 IL-1R2 (pCMV-R2; 理研 BRC, つくば) を用いた。このベクターを鋳型として細胞膜貫通領域の 26 アミノ酸残基 (ASSTFSWGIVLAPLSLAFLVLGGIWM) を欠失させた Δ transmembrane IL-1R2 (ΔTM plasmid) を、Quick change site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) により作製した (図 2)。また、Kudo ら⁹⁾が作製した HiBiT-pIL-1α の C-末端に histidine-tag を同 kit で挿入し、このベクターを HiBiT/His-pIL-1α とした。ΔTM 作製時に使用した primer 配列は次の通りである (forward 5'-CAC CAC AGT CAA GGA ACA CAG ACG GTG CAA AC-3' reverse 5'-GTT TGC ACC GTC TGT GTT CCT TGA CTG TGG TG-3')。作製したすべての plasmid は、DNA sequence 解析 (ファスマック, 厚木) によって DNA 配列に間違いがないことを確認した。なお、pCMV-R2 の transfection によって発現する IL-1R2 を wild type IL-1R2 とした。

Transfection は、Lipofectamine 3000 reagent kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、次のように行った。それぞれの plasmid (250 ng) を OPTI-MEM (25 μ l; GE Healthcare, Chicago, IL, USA) に溶解し、同 kit に含まれる 3000 Reagent (0.75 μ l) と混和した。つぎに、同 kit 中の Lipofectamine 3000 (0.75 μ l) を OPTI-MEM (25 μ l) に溶解した。両溶液を混合し、室温で 15 分間反応させた。反応後、混合液を培養液に添加し、細胞と共に 18 時間培養した。培養後の細胞を transfectant として実験に用いた。

3. 蛍光免疫染色

HeLa 細胞 (5×10^4 cell/well) を 24-well plate 中に置いたカバースリップ (10 mm diameter, 松浪硝子工業, 大阪) に播種し、18 時間培養した。培養後、pIL-1 α および IL-1R2 を transfection し、更に 18 時間培養した。上清を吸引除去し、カバースリップを 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、2% パラホルムアルデヒドにて室温で 10 分間固定した。再び PBS にて洗浄し、1% triton-X 100/PBS を加え、室温で 10 分間処理した。PBS で洗浄し、1% BSA/PBS にて室温で 10 分間非特異的反応のブロッキングを行った。蛍光免疫染色には、一次抗体として mouse anti-histidine monoclonal 抗体 ($\times 100$ 希釈, Proteintech, Rosemont, IL, USA), mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体 ($\times 100$ 希釈, Santa Cruz, Dallas, TX, USA) を、二次抗体として FITC 標識 goat anti-mouse IgG monoclonal 抗体 ($\times 100$ 希釈, Proteintech) を用いた。核染色は、DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) を用いて行った。細胞像は、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X810, キーエンス, 大阪) を用いて観察し、撮影した。

4. ELISA による pIL-1 α の定量

Transfection 後に培養液を交換し、3、6、9 および 12 時間後に回収した培養上清を遠心分離し (16,900 \times g, 1 分間) , 抽出した上清をサンプルとした。Quantikine human IL-1 α ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて pIL-1 α を定量した。

5. Western blot (WB) 法

Transfectant を PBS で洗浄後、細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, diluted in 0.5% Triton X-100, pH7.5) にて細胞を溶解した。溶解液を遠心分離し、抽出された上清を回収してサンプルとした。BioRad protein assay kit (BioRad) を用いてサンプルの総タンパク量を定量し、40 ng のタンパクを 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel を用いて電気泳動した。Immobilon Transfer Membrane (Merck, Germany) に泳動後のタンパクを転写し、1% BSA-PBS でブロッキングした。IL-1R2 の検出には、1 次抗体として mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体 (\times 500 希釈, Santa Cruz) , 2 次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (\times 5000 希釈, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) を用いた。pIL-1 α の検出は、1 次抗体として mouse anti-HiBiT monoclonal 抗体 (\times 1000 希釈, Promega) , 2 次抗体として HRP 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (\times 5000 希釈, Jackson Immuno Research) を使用した。

6. 免疫沈降 (IP) と WB による pIL-1 α と IL-1R2 の複合体の検出

pIL-1 α と IL-1R2 の複合体形成の有無について、IP と WB により確認した。pIL-1 α

の IP は、His-tag に特異的に結合する Nickel-agarose beads (タカラバイオ, 草津) を用いた (表 1) 。また、IL-1R2 の IP は、mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体 (Santa Cruz) と protein G sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare) を用いた。それぞれの IP 後の WB による pIL-1 α および IL-1R2 の検出は、表 1 に示した抗体または検出試薬を用いた。このうち、HiBiT-tag の検出は、HiBiT に特異的に結合する Lg-BiT に HRP を結合させた Nano Glo HiBiT blotting system (Promega) を用いた。

7. 統計学的解析

データの正規性を Shapiro-Wilk 検定, 等分散性を Levene 検定で確認した。表 2 は一元配置分散分析後 Tukey の多重比較を用いて解析した。図 5 は ANOVA の分散分析法を用いて解析した。結果は、平均値 \pm 標準偏差で表した。0.05 未満の p 値は統計学的に有意であるとみなした。

結果

1. pIL-1 α および IL-1R2 の細胞内局在

Transfectant における pIL-1 α および IL-1R2 の発現を WB により確認した。その結果、pIL-1 α は 31 kDa の単一のバンドとして、また IL-1R2 は 59 kDa と 51 kDa の 2 本のバンドとして検出された (図 3)。一方、pcDNA transfectant では、バンドは検出されなかった。以上の結果から、HeLa 細胞においては内在性の pIL-1 α および IL-1R2 は存在しないことが明らかとなった。次に、それぞれの分子の細胞内局在について免疫蛍光染色により確認したところ、pIL-1 α は主に核に局在し、IL-1R2 は核及び細胞質に拡散して存在することが明らかとなった (図 4)。

2. pIL-1 α 分泌量の経時的变化

pIL-1 α transfectant の培養上清中の pIL-1 α 量を、ELISA を用いて経時的に測定した。培地交換後、3 時間で 149.7 ± 11.7 pg/ml, 6 時間で 287.0 ± 27.9 pg/ml, 9 時間で 414.8 ± 27.0 pg/ml, 12 時間で 461.9 ± 8.6 pg/ml となり、経時的に培養上清中の pIL-1 α 濃度は上昇した (図 5)。一方、insert の入っていないコントロールベクターである pcDNA transfectant では pIL-1 α 量は検出限界以下であった。以上の結果から、培地交換後 6 時間で、培養上清中に ELISA によって検出可能な量の pIL-1 α 分泌が認められたことから、以下の実験では、培地交換 6 時間後の培養上清中の pIL-1 α 濃度を測定することとした。

3. IL-1R2 による pIL-1 α の分泌抑制

IL-1R2 が pIL-1 α の分泌にどのような影響を及ぼすのか検討するために、IL-1R2 存在下および非存在下で培養上清中の pIL-1 α 量を測定した。その結果、pIL-1 α をコントロールベクター pcDNA と共に co-transfection した細胞における pIL-1 α 量を 100% としたとき、IL-1R2 と pIL-1 α の co-transfectant した細胞では、pIL-1 α 量は $47.0 \pm 0.2\%$ に低下した (表 2)。次に、IL-1R2 の細胞膜貫通領域の pIL-1 α 分泌に対する影響を確認するために、IL-1R2 の細胞膜貫通領域を欠失させた Δ TM plasmid を pIL-1 α と共に transfection し、培養上清中の pIL-1 α 量を測定した。その結果、pIL-1 α 量は、pIL-1 α のみ transfectant した細胞と比較して、 $26.4 \pm 0.1\%$ にまで低下した (表 2)。この結果から、細胞膜貫通領域を欠失した IL-1R2 は、wild type IL-1R2 よりも、pIL-1 α 分泌に対する抑制効果が高いことが明らかとなった。

4. pIL-1 α と IL-1R2 の結合の確認

pIL-1 α と IL-1R2 の細胞内での結合の有無について、IP とこれに続く WB により確認した。その結果、表 1 に示す①上段の条件で、pIL-1 α 単独および pIL-1 α と IL-1R2 の co-transfectant の両者において 31 kDa の pIL-1 α のバンドが検出された (図 6A)。また、同じメンブレンを抗 IL-1R2 抗体にて WB を行ったところ (表 1①下段)、pIL-1 α と IL-1R2 の co-transfectant においてのみ、IL-1R2 のバンド (59 kDa および 51 kDa) が検出された (図 6B)。また、抗 IL-1R2 抗体で IP したものでは (表 1②の条件)、pIL-1 α と IL-1R2 の co-transfectant においてのみ、pIL-1 α のバンド (31 kDa) が検出された (図 6C)。以上の結果から、pIL-1 α と IL-1R2 が、細胞質内で結合していることが明らかとなった。

考察

pIL-1 α は、processing の結果 ppIL-1 α と mIL-1 α に分断されるが、これら 3 種類の分子のうち pIL-1 α および mIL-1 α のみが機能的分子であるとされる²⁾。また、サイトカインとしての活性は後者の方が高いとされ⁷⁾、細胞内で processing されることにより活性の高い mIL-1 α が細胞外に分泌され、効率的に炎症を惹起するものと考えられている。活性は異なるものの、pIL-1 α および mIL-1 α は細胞外に分泌され、細胞膜表面で両者ともに IL-1R1 に結合する。その後、アクセサリタンパクである IL-1RAcP が会合し、複合体を形成することでシグナルが伝達される。これによって転写因子 NF- κ B や AP-1 カスケードが活性化され、種々のサイトカインが産生されるなどして炎症反応が進行する²⁾。IL-1 family には、構造的に類似した 11 種類の分子があるが、この中で IL-1 receptor antagonist は、IL-1R1 に結合した後、IL-1RAcP との複合体を形成できないため、シグナルが伝達されない^{8,9)}。また、IL-1 family に属する分子である IL-1R2 は IL-1 α または IL-1 β と結合し、さらに IL-1RAcP との複合体を形成するにも関わらず、細胞内領域に TIR ドメインを持たないため、シグナルを伝達できない^{4,8)}。このように IL-1 α シグナルの抑制系が複数存在することは、炎症制御の多様性を示すものであるが、これに加えて Zheng ら⁵⁾は、I 型の膜貫通膜タンパクである IL-1R2 が細胞質内で pIL-1 α と結合し、pIL-1 α の細胞外分泌を抑制するという新たなメカニズムを発見した。これによると、HeLa 細胞と同様に内因性の IL-1R2 の発現が見られない血管平滑筋細胞に対して、IL-1R2 を transfection し、LPS と ATP を作用させると mIL-1 α 分泌が促進された⁵⁾。これは、LPS と ATP による刺激が inflammasome を活性化させ、その構成成分である caspase を活性化させることにより、基質である IL-

IL-1R2 を分解することによるものであった。これによって pIL-1 α と IL-1R2 との結合が解消され、pIL-1 α が細胞内で calpain による分解を受け、生成された mIL-1 α を細胞外に分泌するとされた⁵⁾。

本研究では、HeLa 細胞においても pIL-1 α の細胞外分泌抑制メカニズムが機能するのかという点について検討した。その結果、HeLa 細胞においてもマクロファージなどと同様に、pIL-1 α と IL-1R2 との結合に起因した pIL-1 α の細胞外分泌抑制が見られた。さらに、IL-1R2 の細胞膜貫通領域を欠失した Δ TM では、wild type IL-1R2 よりもさらに高い抑制効果を示した。

また、IL-1R2 は IL-1 α の第 2 のレセプターとしてクローニングされ、細胞膜表面で機能すると考えられている¹⁰⁾。IL-1R2 は、細胞膜外で matrix metalloprotease である ADAM17 によって切断される¹¹⁾。これまでの研究から、IL-1R2 を HeLa 細胞に強制発現させると、IL-1R2 断端が細胞外領域に遊出されることを確認している。このような切断された IL-1R2 の細胞外領域はリガンド結合部を含んでおり、血液中や細胞外液中に放出されると IL-1 α および IL-1 β と結合し、IL-1 α および IL-1 β の作用を抑制することで炎症を終息させる¹²⁻¹⁴⁾。これも、pIL-1 α の効果を減弱させるメカニズムの一つと考えられる。さらに、pIL-1 α のみ transfection された HeLa 細胞から、非常に多くの pIL-1 α が放出されていた。従って、細胞外に分泌された pIL-1 α が、HeLa 細胞の細胞膜表面に発現された IL-1R2 に結合する可能性がある。あるいは、放出された pIL-1 α が、細胞膜表面から酵素的に切断された IL-1R2 の細胞外領域と結合する可能性も考えられる。さらに、こうして形成された pIL-1 α と IL-1R2 複合体は、本研究で用いた ELISA では検出不可能であったのかもしれない。このことは、IL-1R2 が細胞質内

で pIL-1 α 細胞外分泌を抑制しているという解釈とは相容れない現象であることから、本研究で得られた IL-1R2 による pIL-1 α の細胞外分泌抑制メカニズムの詳細についてはさらに検討する必要がある。

IL-1R2 による IL-1 α の細胞外分泌制御は、炎症反応の調節にも深く関係していると考えられる。IL-1R2 による IL-1 α の細胞外分泌機能調節メカニズムの解明は多くの病態の改善や治療法の開発にも貢献しうる可能性があり、今後更なる研究を行う必要があると考える。

結論

IL-1R2 および pIL-1 α を transfection した HeLa 細胞を用いて、以下の結論を得た。

1. HeLa 細胞において、細胞内 IL-1R2 は pIL-1 α の細胞外分泌を抑制した。
2. Transmembrane 領域を欠失した IL-1R2 は、wild type IL-1R2 よりもさらに高い pIL-1 α の細胞外分泌抑制効果を示した。
3. HeLa 細胞内で IL-1R2 と pIL-1 α は結合し、複合体を形成していた。

以上のことから、HeLa 細胞内に存在する IL-1R2 は、pIL-1 α 細胞外分泌抑制効果を維持していることが示唆された。しかし、IL-1R2 による pIL-1 α 細胞外分泌抑制の詳細なメカニズム解明には、さらなる研究が必要であると考えられた。

文献

- 1) Jiang L, Shao Y, Tian Y, Ouyang C, Wang X (2020) Nuclear alarmin cytokines in inflammation. *J Immunol Res* 2020, 7206451.
- 2) Chiu JW, Binte Hanafi Z, Chew LCY, Mei Y, Liu H (2021) IL-1 α processing, signaling and its role in cancer progression. *Cells* 10, 92.
- 3) Supino D, Minute L, Mariancini A, Riva F, Magrini E, Garlanda C (2022) Negative regulation of the IL-1 system by IL-1R2 and IL-1R8: Relevance in pathophysiology and disease. *Front Immunol* 13, 804641.
- 4) Shimizu K, Nakajima A, Sudo K, Liu Y, Mizoroki A, Ikarashi T, Horai R, Kakuta S, Watanabe T, Iwakura Y (2015) IL-1 receptor type 2 suppresses collagen-induced arthritis by inhibiting IL-1 signal on macrophages. *J Immunol* 194, 3156-3168.
- 5) Zheng Y, Humphry M, Maguire JJ, Bennett MR, Clarke MC (2013) Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1 α , controlling necrosis-induced sterile inflammation. *Immunity* 38, 285-295.
- 6) Kudo Y, Tamagawa T, Nishio K, Kaneko T, Yonehara Y, Tsunoda M (2022) Nuclear localization of propeptide IL-1 α in HeLa cells. *J Oral Sci* 64, 151-155.
- 7) 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.
- 8) Schlüter T, Schelmbauer C, Karram K, Mufazalov IA (2018) Regulation of IL-1 signaling by the decoy receptor IL-1R2. *J Mol Med*, 96, 983-992.

- 9) Boraschi D (2022) What is IL-1 for? The functions of interleukin-1 across evolution. *Front Immunol* 13, 872155.
- 10) Liu C, Hart RP, Liu XJ, Clevenger W, Maki RA, De Souza EB (1996) Cloning and characterization of an alternatively processed human type II interleukin-1 receptor mRNA. *J Biol Chem* 271, 20965-20972.
- 11) Uchikawa S, Yoda M, Tohmonda T, Kanaji A, Matsumoto M, Toyama Y, Horiuchi K (2015) ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface. *Cytokine* 71, 238-245.
- 12) Conti P, Panara MR, Porrini AM, Gambi D, Barbacane RC, Reale M, Bongrazio M, Dempsey RA (1992) Inhibition of interleukin-1 (alpha and beta), interleukin-2 secretion and surface expression of interleukin-2 receptor (IL-2R) by a novel cytokine interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra). *Scand J Immunol* 36, 27-33.
- 13) Peters VA, Joesting JJ, Freund GG (2013) IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. *Brain Behav Immun* 32, 1-8.
- 14) Molgora M, Supino D, Mantovani A, Garlanda C (2018) Tuning inflammation and immunity by the negative regulators IL-1R2 and IL-1R8. *Immunol Rev* 281, 233-247.

図および表

表 1 pIL-1 α と IL-1R2 の複合体の検出のための免疫沈降と western blot の条件

沈殿物	IP に用いた reagent	容量	WB 検出 reagent	検出物	図
①pIL-1 α	Nickel-agarose beads	30 μ l	Nano Glo HiBiT	pIL-1 α	図 6 A
	Nickel-agarose beads	30 μ l	mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体	IL-1R2	図 6 B
②IL-1R2	mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体	30 μ l	mouse anti-HiBiT 抗体	pIL-1 α	図 6 C

免疫沈降実験において使用した beads 及び抗体を示す。

表 2 wild type IL-1R2 および Δ TM の pIL-1 α 分泌抑制

transfectant	pIL-1 α 量 (%)
pIL-1 α + pcDNA	100
pIL-1 α + wild type IL-1R2	47.0 \pm 0.2*
pIL-1 α + Δ TM	26.4 \pm 0.1*

pIL-1 α transfectant における細胞外 pIL-1 α 分泌量を 100%とし, wild type IL-1R2 または Δ TM との co-transfectant における細胞外 pIL-1 α 分泌量を示した。5 サンプルを測定し, 結果を平均値 \pm 標準偏差で示した。*: $p < 0.05$ vs. pIL-1 α + pcDNA

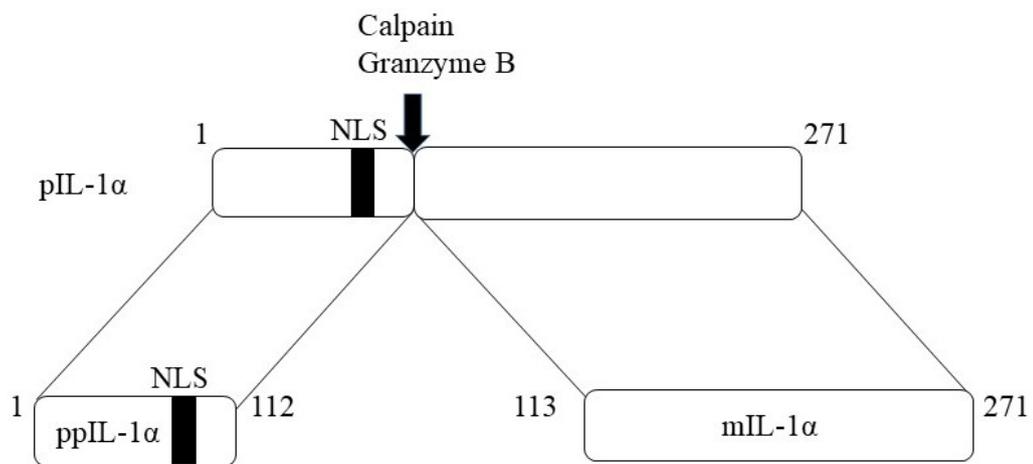


図1 pIL-1α の processing

IL-1α は pIL-1α として細胞質内で産生されたのち、calpain や granzyme B などの酵素により分子のほぼ中央部で切断され、N 末端側の ppIL-1α と C 末端側の mIL-1α に分離する。ppIL-1α 側に NLS 配列が存在する²⁾。

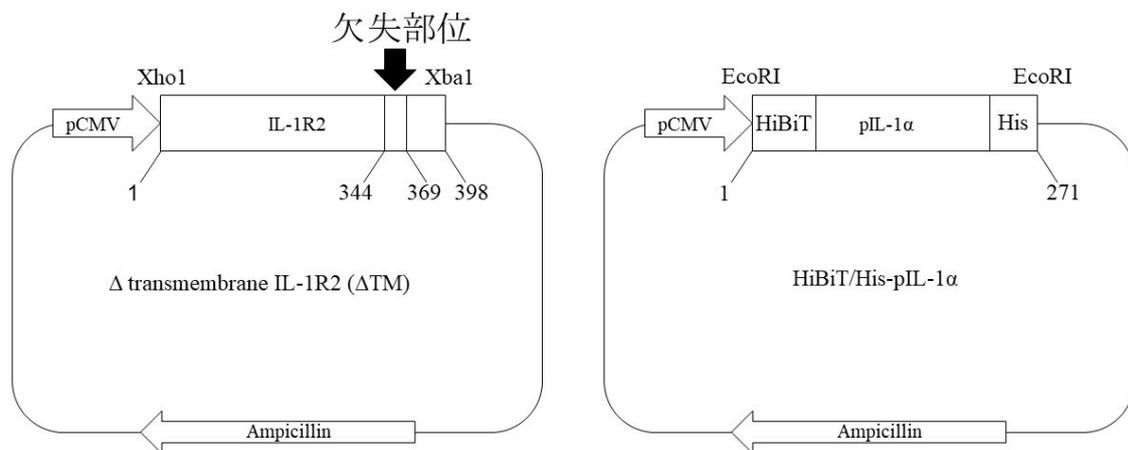


図2 Transfection に用いたベクター

ベクターの Xho1, Xba1 間に IL-1R2 を挿入した pCMV-SPORT 6 IL-1 receptor type 2 (pCMV-R2) を鋳型として transmembrane 領域 (黒矢印) である 344-369 のアミノ酸配列を欠失させた Δ transmembrane IL-1R2 (Δ TM) を作製した (左図)。pcDNA の EcoRI 間へ N-末端に HiBiT-tag が付与されている pIL-1 α を挿入した HiBiT-pIL-1 α の C-末端に histidine-tag を付与した HiBiT/His-pIL-1 α を作製した (右図)。

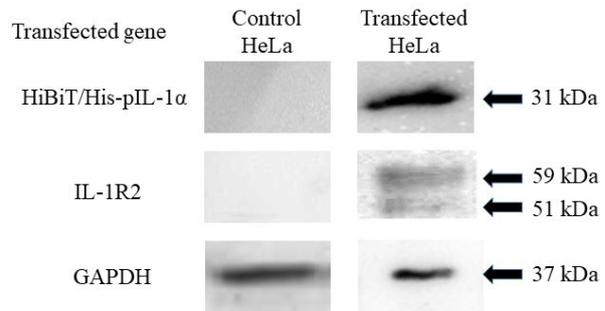


図3 Transfectant における pIL-1 α および IL-1R2 の発現

pIL-1 α は 31 kDa の単一のバンドとして、IL-1R2 は 59 kDa と 51 kDa の 2 本のバンドとして検出された。Control HeLa 細胞ではバンドが検出できなかった。

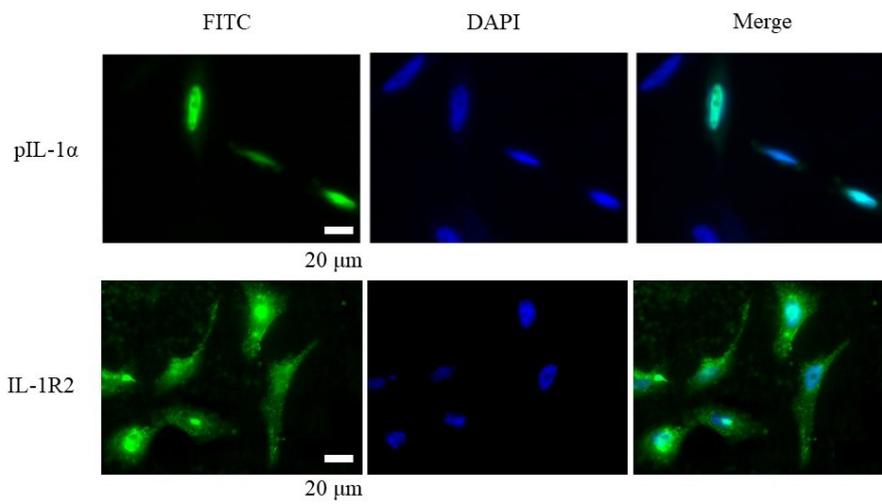


図4 Transfectant における pIL-1 α および IL-1R2 の細胞内局在

pIL-1 α または IL-1R2 を transfection した HeLa 細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

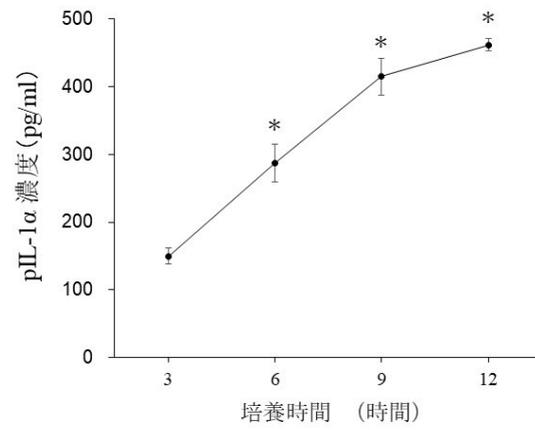


図5 pIL-1α 分泌量の経時的変化

同じ実験を5回繰り返し、それぞれのサンプルを triplicate で測定した。平均値 ± 標準偏差でデータを示した。*: $p < 0.05$ vs. 3 時間後の pIL-1α 濃度

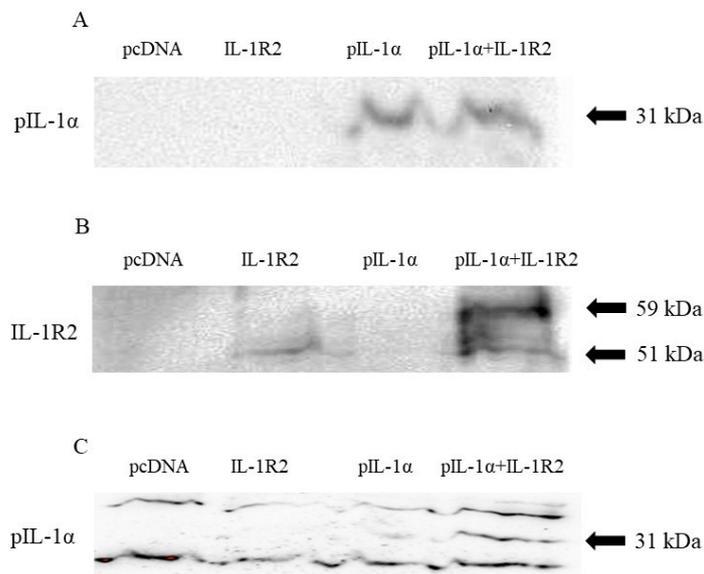


図6 pIL-1 α と IL-1R2 の結合

pcDNA 単独, IL-1R2 単独, pIL-1 α 単独および pIL-1 α と IL-1R2 の co-transfectant の細胞溶解液を調整し, 表 2 の方法によって IP および WB を行った。A: 表 1①の方法で IP を行い, Nano Glo HiBiT により pIL-1 α を検出した。B: 表 1①の方法で IP を行い, mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体で IL-1R2 の検出を行った。C: 表 1②の方法で IP を行い, muse anti-HiBiT 抗体で pIL-1 α の検出を行った。