

In vitro transcription/translation 法により作製した mature interleukin-1 α と propiece interleukin-1 α の機能比較

高 田 礼 央

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔健康科学分野

(指導: 白川哲夫 教授, 浅野正岳 教授)

要旨

目的: *in vitro* transcription/translation 法で作製した recombinant mature interleukin-1 α (rmIL-1 α) と recombinant propiece interleukin-1 α (rppIL-1 α) のサイトカイン産生誘導能について検討した。

方法: 発現ベクター pcDNA-mIL-1 α 及び pcDNA-ppIL-1 α を用いて rmIL-1 α と rppIL-1 α を作製し, rmIL-1 α は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 及び western blot 法で, rppIL-1 α は western blot 法で産生を確認した。ヒト肺腺癌由来 A549 細胞を用いて rmIL-1 α 及び rppIL-1 α のサイトカイン産生誘導能を比較した。

結果: ベクターの形状にかかわらず, ほぼ同量の rmIL-1 α が産生された。rmIL-1 α 及び rppIL-1 α は, それぞれ 19 kDa 及び 18 kDa の単一バンドとして確認された。A549 細胞に対する IL-8 産生誘導能を調べたところ, rmIL-1 α でのみ誘導能が観察され, rppIL-1 α では確認されなかった。

結論: 作製した rmIL-1 α 及び rppIL-1 α は, A549 細胞によるサイトカイン産生に対して異なる効果を有し, rmIL-1 α のみが IL-6 と IL-8 両方の産生誘導能を有していた。

キーワード: interleukin-1 α , *in vitro* transcription/translation 法, recombinant タンパク質

Functional comparison between mature and propiece interleukin-1 α generated by *in vitro* transcription/translation method

Leo Takada

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Applied Oral Sciences

(Director: Prof. Tetsuo Shirakawa and Prof. Masatae Asano)

Abstract

Purpose: The cytokine production-inducing ability was compared between recombinant mature interleukin-1 α (rmIL-1 α) and recombinant propiece interleukin-1 α (rppIL-1 α) prepared by the *in vitro* transcription/translation method.

Methods: Employing pcDNA-mIL-1 α and pcDNA-ppIL-1 α vectors, rmIL-1 α and rppIL-1 α were produced and confirmed subsequently by enzyme-linked immunosorbent assay/western blot method and western blot method, respectively. Using A549 cells derived from human lung adenocarcinoma, the cytokine production-inducing ability of rmIL-1 α and rppIL-1 α was compared.

Result: No significant difference was observed between the cyclic and linearized pcDNA-mIL-1 α vectors in terms of the amount of recombinant protein produced with them. rmIL-1 α and rppIL-1 α were identified as bands of 19 kDa and 18 kDa proteins, respectively. Induction of IL-8 was observed when A549 cells were stimulated with rmIL-1 α but not with rppIL-1 α .

Conclusion: It was clarified that rmIL-1 α and rppIL-1 α produced by the *in vitro* transcription/translation method had different effects on the induction of IL-6 and IL-8 and that rmIL-1 α but not rppIL-1 α had an ability to induce both IL-6 and IL-8 in A549 cells.

Keywords: interleukin-1 α , *in vitro* transcription/translation method, recombinant protein

(受付: 令和3年2月4日)

責任著者連絡先: 高田礼央

日本大学歯学部 小児歯科学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL : 03-3219-8106

FAX : 03-3219-8353

E-mail : galonleo@gmail.com

緒 言

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せるために放出する物質は danger-associated molecular patterns または alarmin と総称される^{1,2)}。Alarmin には、Interleukin(IL)-1 α 、IL-33 や high-mobility group box-1 などの分子が含まれている。その中で IL-1 α は約 34 kDa の前駆体 precursor IL-1 α (pIL-1 α) として細胞内で産生され³⁾、Ca²⁺ 依存性タンパク質分解酵素であるカルパイン⁴⁾や、好中球などが産生する granzyme B (GzmB)⁵⁾ などによって分子のほぼ中央部分を切断され、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) が生じる。従って、IL-1 α 分子には pIL-1 α 、mIL-1 α 及び ppIL-1 α の 3 分子種が存在する。この中で ppIL-1 α は分子内に nuclear localizing sequence (NLS) が存在し、主に核に局在するとされ、機能的には遺伝子発現に関与する可能性が報告されている⁶⁾。しかし、その詳細は全く不明である。

本研究では、*in vitro* transcription/translation 法を用いて recombinant mIL-1 α (rmIL-1 α) 及び recombinant ppIL-1 α (rppIL-1 α) を作製した。肺腺癌由来の A549 細胞を用いた先行研究⁷⁾では、mIL-1 α 刺激によって同細胞が IL-6 及び IL-8 を産生することが報告されているため⁷⁾、本研究では、作製した rmIL-1 α 及び rppIL-1 α により A549 細胞を刺激し、これらサイトカインの産生誘導能の有無を検証した。

材料および方法

・細胞

ヒト肺腺癌由来上皮細胞である A549 細胞は、JCRB 細胞バンク (茨木、大阪) より入手した。細胞培養には、Dulbecco's minimum essential medium (DMEM;

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に、10% ウシ胎児血清 (FCS; Biosera, Nuaille, France)、1% non-essential amino acid (Merck, Darmstadt, Deutschland) 及び 1% L-glutamine-penicillin-streptomycin (Merck) を添加した 10% FCS-DMEM を用いた。

・発現 plasmid と *in vitro* transcription/translation

Sata ら⁸⁾ により作製された発現ベクター pcDNA-mIL-1 α 及び pcDNA-ppIL-1 α (図 1) の供与を受けて、*in vitro* transcription/translation 法によって recombinant タンパク質を作製した。作製にあたっては、TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、plasmid 1 μ g に 1 mM methionine 1 μ L 及び *in vitro* transcription/translation mixture を 40 μ L 加え、30°C で 90 分間反応させた。コントロール反応では pcDNA を用いた。それぞれの発現ベクターを用いることで得られた recombinant タンパク質を rmIL-1 α 及び rppIL-1 α とした。また、pcDNA-mIL-1 α を制限酵素 *Xho* I により直鎖化して同様の反応を行い、環状 DNA を用いた場合の rmIL-1 α 産生とともに作製されたタンパク質について検討した。rmIL-1 α については Quantikine Human IL-1 α ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) により定量を行った。rppIL-1 α については、100 mg/mL のウシ血清アルブミン (BSA; 富士フイルム和光純薬、大阪) の段階希釈溶液とともに、10% sodium dodecyl persulfate ポリアクリルアミドゲル (10% SDS-PAGE; BIO-RAD, Berkeley, CA, USA) にて電気泳動し、Coomassie Brilliant Blue (CBB; BIO-RAD) 染色を行った。バンド濃度を Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) で計測し、段階希釈した BSA のバンド濃度から作成した検量線をもとに、rppIL-1 α のタンパク質濃度を求めた。

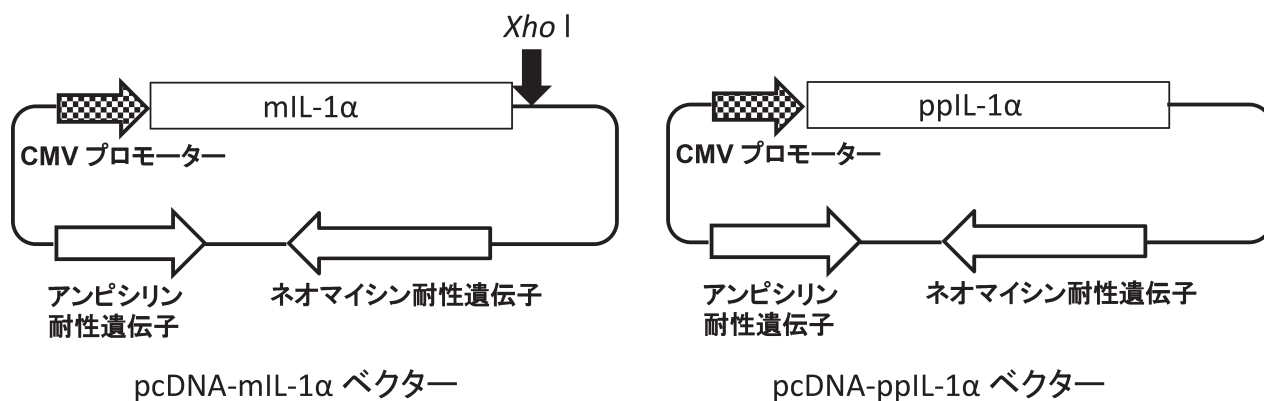


図 1 発現ベクター pcDNA-mIL-1 α および pcDNA-ppIL-1 α
Xho I: 直鎖化に用いた制限酵素

・Western blotting

合成反応終了後の *in vitro* transcription/translation 反応液を 5 μ L 採取し, sample buffer と混和し, 95 $^{\circ}$ C で 3 分間反応させた後, 10% SDS-PAGE により電気泳動した。泳動後, Immobilon Transfer Membrane (Merck) に転写し, 1% BSA-リン酸緩衝生理食塩水により非特異的反応部のブロッキングを行った。1次抗体としてウサギ抗ヒト IL-1 α 抗体 (500 倍希釈; Abcam, Cambridge, UK), 2次抗体として horseradish peroxidase 標識のヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (5,000 倍希釈; Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) と反応させ, Enhanced chemiluminescence western blotting substrate kit (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を用いて発光させた。画像の取り込みは ChemiDoc XRS imaging system (BIO-RAD) によって行った。

・細胞の刺激

合成反応終了後の *in vitro* transcription/translation 反応液を, 10% FCS-DMEM により 100 倍, 1,000 倍及び 10,000 倍に希釈した。これらの希釈液 400 μ L を用いて A549 細胞 (1×10^5 /well, 24-well plate) を 18 時間培養した。pcDNA を用いたコントロール反応液を同様に 100 倍に希釈し A549 細胞の培養に用いた。培養後の上清を回収し, 14,000 \times g で 2 分間遠心し, 上清をサンプルとした。サンプルにおける IL-6 及び IL-8 濃度は, Quantikine Human IL-6, IL-8 ELISA kit (R&D systems) により測定した。

・統計学的解析

Jarque-Bera 検定で正規性を確認した後に, Tukey-Kramer 法により有意差を検定した。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

・rmIL-1 α の産生

pcDNA-mIL-1 α を制限酵素 *Xho* I により直鎖化し, アガロースゲル電気泳動を行い, 直鎖化していないものと比較した結果を図 2 に示す。直鎖化したものは 6.2 kb の位置に 1 本のバンドを確認したのに対し, 直鎖化していないものでは 6.2 kb に加えて 7.2 kb, 7.3 kb の位置にバンドが確認できた。環状及び直鎖化した発現ベクターを用いて *in vitro* transcription/translation を行い, その反応産物 1 μ L について抗 IL-1 α 抗体を用いて western blot を行った。その結果, ベクターの直鎖化の有無に関わらず, 19 kDa の位置に IL-1 α 陽性バンドが検出された (図 3)。

環状及び直鎖化したベクターにより産生された rmIL-1 α を ELISA にて定量した結果, 鋳型 DNA 100 ng に対して産生されたタンパク質量は, 環状ベクターでは 6.1 ± 0.2 ng/ μ L ($n = 3$), 直鎖化したベクターでは 5.4 ± 0.8 ng/ μ L ($n = 3$) で, 平均 5.8 ± 0.6 ng/ μ L であった。

・rppIL-1 α の産生

rppIL-1 α を rmIL-1 α と同様の方法で作製し, 段階希釈した反応産物を western blot にて検討した。その結果, 図 4 に示した通り, rppIL-1 α は 18 kDa の単一の IL-1 α 陽性バンドとして検出され, 希釈に伴うバンド濃度の減少が認められ, これによって, *in vitro* transcription/translation 法による rppIL-1 α 産生が確認できた。そこで段階希釈した BSA を利用して作成した検量線をもとに rppIL-1 α の定量を行い, 以下の実験に供した。

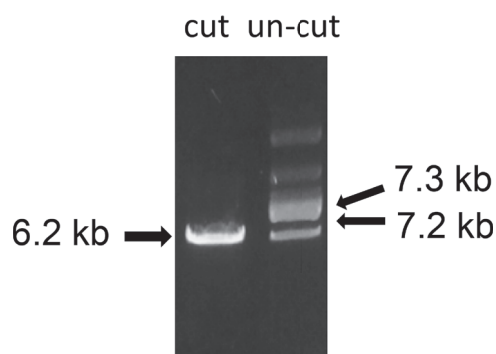


図 2 pcDNA-mIL-1 α の直鎖化の確認
発現ベクター pcDNA-mIL-1 α を *Xho* I により直鎖化したもの (cut) および直鎖化していないもの (un-cut) を 0.8% アガロースゲル電気泳動により展開した。

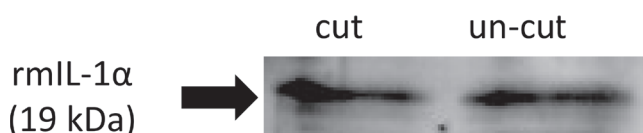


図 3 rmIL-1 α の western blot
発現ベクター pcDNA-mIL-1 α を直鎖化したもの (cut) と直鎖化していないもの (un-cut) を用いて *in vitro* transcription/translation を行った。反応産物 1 μ L を 10% SDS-PAGE により展開し, 抗ヒト IL-1 α 抗体を用いて western blot を行った。



図 4 ppIL-1 α の産生確認
In vitro transcription/translation 反応により作製した rppIL-1 α を, 段階的に希釈して 10% SDS PAGE に展開し, 抗ヒト IL-1 α 抗体により western blot を行った。

・rmIL-1 α 存在下での A549 細胞による IL-6, IL-8 産生
 作製した rmIL-1 α がサイトカイン産生に及ぼす効果について、肺腺癌由来の A549 細胞を用いて検討した。段階希釈した rmIL-1 α を A549 細胞に作用させ、ELISA によって IL-6 及び IL-8 産生量を測定した(図 5)。その結果、IL-6, IL-8 の産生量は、いずれも rmIL-1 α 濃度依存的に、コントロールと比較して有意に増加した(図 5)。IL-6 産生量は、rmIL-1 α 100 倍希釈において 486 ± 25 pg/mL ($n = 5$)、IL-8 産生量は、 6.4 ± 0.4 ng/mL ($n = 5$) であった。すなわち、rmIL-1 α 刺激を受けた A549 細胞で産生される IL-8 は、IL-6 に比べてより高濃度であった。

・rppIL-1 α 存在下での A549 細胞による IL-8 産生

rppIL-1 α 刺激を受けた A549 細胞による IL-8 産生量は、rmIL-1 α 刺激による IL-8 産生量 (4.1 ± 0.2 ng/mL, $n = 5$) と比較して極めて低値であり、その量は、無刺激のネガティブコントロールあるいは insert を含まない pcDNA による合成反応溶液での値とほぼ同程度であった(図 6)。すなわち、A549 細胞は、rmIL-1 α 刺激によって IL-8 を産生したが、rppIL-1 α 刺激による IL-8 産生誘導は認められなかった。

考 察

本研究では、*in vitro* transcription/translation 法によって作製した rmIL-1 α 及び rppIL-1 α を用いてサイトカイン産生誘導能の違いについて検討した。タンパク質の発現には哺乳類細胞で発現を誘導できる plasmid として pcDNA を用いた。このベクターでは T7 RNA ポリメラーゼによる転写開始が可能であり、本実験においては効率よく recombinant タンパク質を作製することが出来

た。ベクターの形状の変化がタンパク質産生量に及ぼす影響について検討したところ、制限酵素によるベクターの直鎖化が、反応効率に影響を及ぼさないことが明らかとなった。そこで、本研究での rmIL-1 α ならびに rppIL-1 α の産生は、直鎖化しないベクターを用いて行うこととした。

得られた recombinant タンパク質の確認は western blot 法と ELISA 法を用いたが、これまでに市販されてきた抗 IL-1 α 抗体は、大部分のものが rmIL-1 α を免疫原として得られたものであり、ppIL-1 α に対する特異抗体はほとんど存在しない。このため、作製された rppIL-1 α の濃度を正確に測定するための ELISA system は存在しない。そこで本研究では、同じ plasmid 量を用いて得た反応産物を、同じ希釈倍率で培養液に添加して A549 細胞を刺激することによって実験を行った。mIL-1 α は多くの機能を有するサイトカインであるとされるが⁹⁾、ppIL-1 α の機能についてはごく一部が判明しているに過ぎない⁶⁾。

一方、細胞内で産生された pIL-1 α は、分子内に存在する NLS によって核内に局在するとされるが、細胞膜に局在するとの報告もなされている^{10,11)}。pIL-1 α を切断する酵素にはカルパイン^{4,12)}や thrombin¹³⁾などが知られており、GzmB の様に細胞外でも酵素活性を示すものもある⁵⁾。こうした事実は、細胞膜に局在する pIL-1 α 、または細胞外に分泌される pIL-1 α が、細胞外において切断される可能性があることを示している。こうした酵素的切断が細胞外で起こった場合に生じる ppIL-1 α が、細胞外において何らかの活性を示す可能性は否定できない。しかし、これまで ppIL-1 α 自体の機能を追究した報告は皆無であり、その点に焦点をあてた IL-1 α の機能検

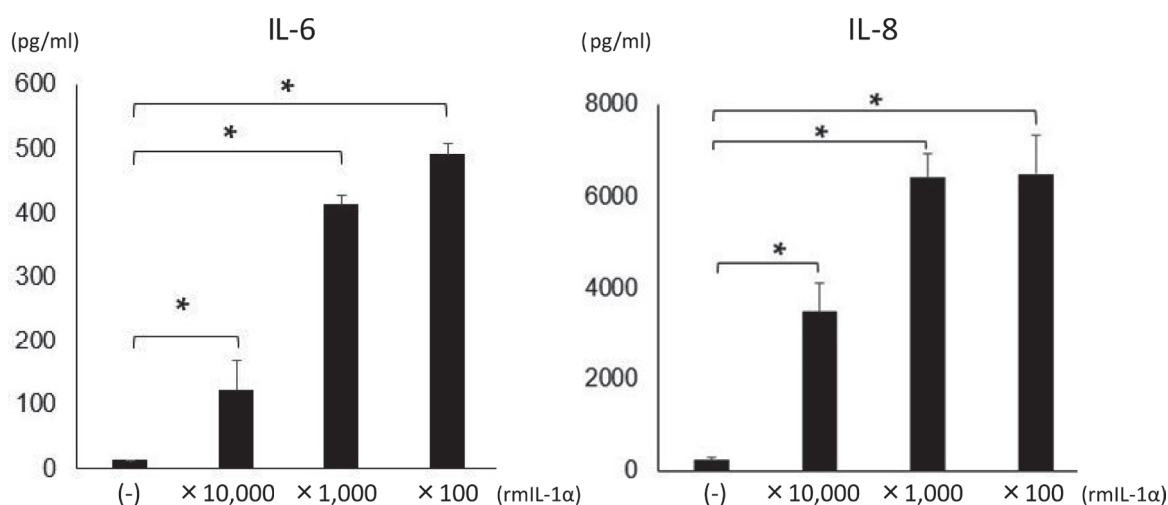


図 5 A549 細胞に対する rmIL-1 α の IL-6, IL-8 産生誘導能
 肺腺癌由来 A549 細胞に対して、*in vitro* transcription/translation 反応により作製した rmIL-1 α を段階的に希釈し、作用させた。産生された IL-6 および IL-8 の濃度を ELISA により測定した ($n = 5$ /column)。(.)はコントロールで rmIL-1 α で刺激していない A549 細胞の培養上清とした。* $P < 0.05$

索の意義は大きいと考える。本研究ではこうした背景に基づき検討を行ったが、rppIL-1 α 刺激は A549 細胞における IL-8 産生を誘導しなかった。

Kimら⁷⁾は大腸菌で作製した recombinant mIL-1 α 及び recombinant pIL-1 α を用いた研究により、両者がともに A549 細胞に対して IL-1 Receptor type 1 を介して IL-6 及び IL-8 産生を誘導し得ることを確認している。本研究では、rppIL-1 α が A549 細胞における IL-6 産生を誘導しないという結果であったが、このことは、IL-6 産生誘導の活性が、pIL-1 α の N 末端領域に依存するものではない可能性を示唆するものであり大変興味深い。一方で、本研究で得られた rppIL-1 α 濃度は極めて低く、培養液への添加量が IL-8 産生を誘導できる濃度レベルでなかった可能性もある。ppIL-1 α のサイトカイン産生誘導能の有無は、今後も検討継続する必要があると考える。なお、ppIL-1 α に対する特異的抗体が存在しない状況下で、rppIL-1 α の *in vitro* transcription/translation 法による調製は、より多くの recombinant タンパク質の生成を実現し、ppIL-1 α 特異的なモノクローナル抗体の作製や、ppIL-1 α 定量系の確立などの可能性にもつながると考える。

結 論

本研究では *in vitro* transcription/translation 法によって作製した rmIL-1 α 及び rppIL-1 α について以下の結論を得た。

1. *in vitro* transcription/translation 法による rmIL-1 α タンパク質の産生は、環状あるいは直鎖状という発現ベクターの形状には影響を受けなかった。
2. 得られた rmIL-1 α 及び rppIL-1 α は、それぞれ 19 kDa 及び 18 kDa の単一バンドとして検出された。

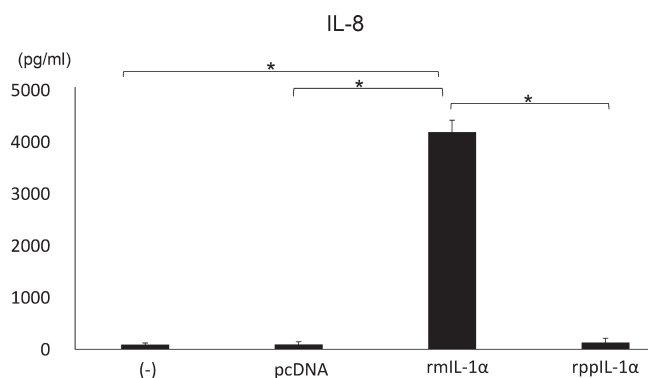


図6 rmIL-1 α および rppIL-1 α による IL-8 産生誘導能の比較
A549 細胞に対して、*in vitro* transcription/translation 反応により作製した rmIL-1 α および rppIL-1 α を作用させ、IL-8 の産生量を ELISA により測定した (n = 5/column)。無刺激の細胞培養上清。pcDNA: コントロールベクターを用いた、*in vitro* transcription/translation 反応産物を加えた細胞培養上清。* $P < 0.05$

3. ヒト肺腺癌由来の A549 細胞に対する rmIL-1 α 刺激は、IL-6 及び IL-8 産生を濃度依存的に誘導した。
4. A549 細胞において rppIL-1 α 刺激は IL-8 の産生誘導を惹起しなかった。

以上のように、*in vitro* transcription/translation 法によって得られた rmIL-1 α 及び rppIL-1 α は、IL-1 α 関連分子の生理活性や機能分析のための培養実験に供することができるほか、特異抗体の作製における免疫原としても活用が可能と考えられた。

本論文の作成にあたり、小児菌科学講座 白川哲夫教授および日本大学病理学講座 浅野正岳教授にご指導いただきました事を心より感謝申し上げます。また、実際に実験を推進するにあたって多くのご助言とご指導をいただきました両教室の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

本論文に関して、開示すべき利益相反はありません。

文献

- 1) Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17, 359-365.
- 2) Rider P, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN, Cohen I (2017) Alarmins: Feel the stress. *J Immunol* 198, 1395-1402.
- 3) Di Paolo NC, Shayakhmetov DM (2016) Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol* 17, 906-913.
- 4) 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 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5548-5552.
- 5) 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.
- 6) Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN (2004) The precursor form of IL-1 alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2434-2439.
- 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) 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.
- 9) Dinarello CA (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27, 519-550.
- 10) Brody DT, Durum SK (1989) Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *J Immunol* 143, 1183-1187.

- 11) Stevenson FT, Bursten SL, Fanton C, Locksley RM, Lovett DH (1993) The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7245-7249.
- 12) Carruth LM, Demczuk S, Mizel SB (1991) Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 alpha precursor. *J Biol Chem* 266, 12162-12167.
- 13) Burzynski LC, Humphry M, Pyrillou K, Wiggins KA, Chan JNE, Figg N, Kitt LL, Summers C, Tatham 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.