

4000523

インターフェロン誘発物質ポリ I:C の
レセプター単離に関する研究

(60570204)

昭和61年度

科学研究費補助金(一般研究C)研究成果報告書

昭和62年3月

研究代表者 吉田逸朗

(旭川医科大学 医学部 助手)

は し が き

研究組織

研究代表者：吉田逸朗（旭川医科大学 医学部 助手）

研究経費

昭和60年度 1,200千円

昭和61年度 300千円

計 1,500千円

研究発表

(ア) 学会誌等

(1) Itsurou Yoshida and Masanobu Azuma "Adsorption of Poly rI:rC on Cell-Membrane Participating and Nonparticipating in Interferon Induction" *Journal of Interferon Research* vol 5 (1985)

(2) Itsurou Yoshida, Masanobu Azuma and Hideki Kawai "Analysis of Specific Receptors for Poly rI:rC on Cell Membranes Participating in Interferon Induction" *Archives of Virology* (投稿中)

(イ) 口頭発表

吉田逸朗

「インターフェロン誘発特異的ポリ I:C レセプターの解析」

日本ウイルス学会総会（1985年）

吉田逸朗

「インターフェロン誘発に關与する特異的ポリ I:C レセプターの解析」

日本ウイルス学会総会（1986年）

研 究 成 果

要 約

インターフェロン誘発に関与する細胞表層のポリ I:C レセプターの単離及び解析を試み、以下の結果を得た。

1. RK-13細胞及びポリ I:C 抵抗性 PR-RK細胞を用いた実験から、ポリ I:C とポリ A:U とではレセプターが異なる事—即ち、ポリ I:C レセプターの特異性が示唆された。
2. RK-13細胞の細胞膜から、ポリ I:C-アガロースゲルによるアフィニティクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーにより、ポリ I:C レセプターを部分精製することができた。
3. 部分精製したポリ I:C レセプターは、分子量が各々、95K、80K、66K、59K、25K の、5種類のポリペプチドを含んでおり、単クローン抗体を用いた解析結果から、これらのポリペプチドのうち、59K の分子量のものが、ポリ I:C の結合部位を構成していると推定された。
4. 細胞融合法により作製した単クローン抗体の中に、ポリ I:C レセプターのポリ I:C 結合部位を認識して、細胞へのポリ I:C の結合を阻害する事により、インターフェロン産生を抑制する抗体の他に、ポリ I:C によるインターフェロン産生を増強する効果を持つ抗体が見出された。

緒 言

ポリ I:C は、ポリイノシン酸とポリシチジル酸とが、相補的水素結合により 2 本鎖を形成した、分子量百万以上の合成 RNA で、生物個体、培養細胞いずれの系においても、強いインターフェロン誘発能を有する。このポリ I:C が如何なる機序でインターフェロン遺伝子の発現抑制を解除するのかについては、ポリ I:C 分子が細胞内に入る必要があるのか否かの議論を含めて、全く解明されていない。筆者は、このポリ I:C によるインターフェロン誘発機構について、特に、その初期の段階に関与する因子—即ち、ポリ I:C 分子と細胞表層との相互作用の開始点となる、ポリ I:C レセプターに着目して研究を行なった。このポリ I:C レセプターは、ポリ I:C によるインターフェロン誘発に関する研究の早期の頃から、その存在が推論されているにも関わらず、これまで解析が行われていなかった。その最大の理由は、ポリ I:C の細胞への結合の中に、インターフェロン誘発に直接関与しない、非特異的な吸着が多く含まれ、特異的な結合を解析する実験系がなかったためである。筆者らが樹立したポリ I:C 抵抗性培養細胞株 PR-RK細胞は、インターフェロン誘発に関与するポリ I:C レセプターの欠損した細胞であると考えられ(1)、その親株である RK-13細胞と組み合わせる事により、ポリ I:C レセプター解析のための格好の系を提供するものである。この系を用いて、インターフェロン誘発に関与するポリ I:C レセプターの解析を行なった。

成 績

1. RK-13細胞及び PR-RK細胞の性状

ウサギ腎由来培養細胞株RK-13細胞を、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のポリ I:Cで処理すると、細胞の多くはポリ I:Cの毒性により死滅するが、生き残る細胞も認められる。生き残った細胞を増殖させ、再びポリ I:Cで処理すると、死滅する細胞の比率は減少した。このポリ I:C処理を総計5回繰り返す事によって得られた細胞は、 $1,000\mu\text{g}/\text{ml}$ のポリ I:Cで処理しても全く死滅せず、ポリ I:C抵抗性を獲得していた。この細胞 (PR-RK細胞) は、同時に、ポリ I:C誘発によるインターフェロン産性能も失っていた。

このPR-RK細胞及びRK-13細胞へのポリ I:Cの結合量をフローサイトメトリー (昭和電工製セルソーターCS20)により比較した結果が図1である。この図の横軸は、2本鎖核酸に結合するエチジウムブロマイドの蛍光強度を示しており、右の方向、細胞当りの蛍光強度が強い事—即ち、2本鎖核酸の量が多い事を示す。RK-13細胞をポリ I:Cで処理した時の蛍光強度の増加の程度は、PR-RK細胞の場合より著しく大きい。この事は、PR-RK細胞へのポリ I:Cの結合量がRK-13細胞に比較して著しく減少している事を示す。この事実及び、PR-RK細胞をポリ I:C以外の誘発方法で誘発した場合には、インターフェロン産生が認められ、PR-RK細胞がインターフェロン遺伝子を保持していると考えられる事(1)などから、PR-RK細胞が、ポリ I:C誘発によるインターフェロン産生能を失った理由は、インターフェロン誘発に関与するポリ I:Cレセプターの欠損によるものであると考えられる。

2. ポリ I:Cレセプターの特異性

ポリアデニル酸とポリウリジル酸との2本鎖RNAであるポリ A:Uにも、ポリ I:Cと同様の細胞毒性が認められる。このポリ A:Uに対する感受性をRK-13細胞とPR-RK細胞について比較した結果が図2である。RK-13細胞は、ポリ I:C及びポリ A:Uのいずれに対しても感受性を有する。一方、PR-RK細胞は、ポリ I:Cに対しては完全に抵抗性であるが、ポリ A:Uに対してはRK-13細胞と同様の感受性を示した。この事は、PR-RK細胞が、ポリ I:Cレセプターは欠損しているが、ポリ A:Uレセプターは保持している事、従って、ポリ I:Cとポリ A:Uとではレセプターが異なる事を示している。即ち、インターフェロン誘発に関与するポリ I:Cレセプターは、RNAの種類に対して特異性を有すると考えられる。

3. 特異的ポリ I:Cレセプターの単離

特異的ポリ I:Cレセプターの欠損したPR-RK細胞を対照として、RK-13細胞からの、このレセプターの単離を試みた。培養したRK-13細胞をスクレイプして採集し、ダウンス型ホモジナイザーで破碎した後、ポリエチレングリコールとデキストランの系による水性2相法で細胞膜を分画した。細胞膜からのポリ I:Cレセプターの分離には、アフィニティクロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィーを用いた。即ち、まず細胞膜を超音波処理した後、界面活性剤 (0.5% NP40) で処理し、 $10,000\times g$ で遠心して得られる上清を、可溶性膜画分とした。次いで、ポリ I:Cを共有結合させたアガロースゲル (ファルマシア社製ポリ I:Cアガロース) を 0.14M のNaClを含む 10mM リン酸バッファー (PBS pH7.4) に懸濁し、ゲル体積 1ml のカラムを製作して、これに可溶性膜画分を通した。ポリ I:Cに結合してカラム内に残った成分は、バッファーのイオン強度を $1/100$ に下げて ($1/100\times\text{PBS}$)、ポリ I:Cの水素結合を切断することにより溶出させた。(図3)。

この溶出画分を高速液体クロマトグラフィー(Mono Q カラム/ファルマシア社 FPLCシステム)により更に分画した。まず1回目の高速液体クロマトグラフィーによって、試料中に混在するRNAポリマーを除去した後、蛋白画分を再度、高速液体クロマトグラフィーで分画した結果が図4である。図中の破線は、カラムから溶出させるためのグレイディエント(1/100×PBS→PBS)を示す。280nmの吸光度パターンが示すように、種々の成分が存在している。この溶出画分のどこに、インターフェロン誘発に関与するポリI:Cレセプターが存在するかを、ラジオイムノアッセイ法(RIA法)により検索した結果が、図4中の挿入図である。このRIA法には、RK-13細胞を免疫原として作製したBALB/cマウスの抗血清を、PR-RK細胞で吸収したものを、ポリI:Cレセプターに対する特異抗体として用いた。このRIA法による検索の結果から、ポリI:Cレセプターは、グレイディエントの28%の点をピークにして溶出して来ると言える。PR-RK細胞から分画した可溶化膜画分についても同様の検索を行なったが、これに該当するピークは検出されなかった。従って、RK-13細胞から得られたピークが、インターフェロン誘発に関与する特異的ポリI:Cレセプターの存在を示していると考えられる。ただし、ピークの形から判断すると、その他の成分も共存している可能性は否定できない。

4. SDS-PAGEによるレセプターの解析

高速液体クロマトグラフィーにより得られた、特異的ポリI:Cレセプター画分を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)及び銀染色法で解析した結果が図5である。この図の(1)のレーンは、分子量のマーカー蛋白、(2)のレーンがレセプター画分である。分子量が、各々、95K、80K、66K、59K、及び25Kの5種類のポリペプチドのバンドが認められる。これら全てが、レセプター分子のサブユニットであると仮定して単純計算すると、レセプター分子の分子量は、325,000と推定される。

5. レセプターに対する単クローン抗体の作製

特異的ポリI:Cレセプターの更なる精製及び解析には、単クローン抗体が有効と考えられたので、その作製を試みた。BALB/cマウスを、前もってRK-13細胞で免疫し、脾臓摘出の3日前に、RK-13細胞の細胞膜から分画した特異的ポリI:Cレセプター画分を接種して最終免疫を行なった。免疫マウスから得られる脾細胞を、ポリエチレングリコール法によってマウスミエローマ細胞(P3×63-653)と融合させ、HAT選択法によりハイブリドーマを育種した。特異的ポリI:Cレセプターに対する抗体を産生するハイブリドーマの選別は、RK-13生細胞を抗原として、ペルオキシダーゼ標識2次抗体を用いる酵素抗体法(ELISA法)により行った。得られた抗体産生ハイブリドーマを限界希釈法でクローン化した後、BALB/cマウスの腹腔に接種して、単クローン抗体含有腹水を得た。

6. 単クローン抗体による細胞レベルでのレセプターの解析

得られた単クローン抗体でRK-13細胞を処理した後、ポリI:Cで誘発してインターフェロン産生を調べた所、(1)インターフェロン産生を抑制する抗体、(2)インターフェロン産生を増強する抗体、(3)インターフェ

ロン産生に影響を及ぼさない抗体の3種類の単クローン抗体がある事が判った。(3)の抗体は、RK-13細胞表層のポリ I:C レセプターに関係しない成分を認識すると考えられる。(1)の抗体は、レセプター分子のポリ I:C 結合部位を認識する抗体と考えられ、立体障害によってポリ I:C のレセプターへの結合を阻害する事により、インターフェロン産生を抑制すると推定される。(2)の抗体については、そのインターフェロン産生増強効果の機序は、現在の所不明である。作業仮説として、レセプター分子上又はその近傍に、ポリ I:C 結合部位のポリ I:C に対する親和性を調節する構造が存在する可能性、あるいは、ポリ I:C 結合後の、インターフェロン遺伝子抑制解除のシグナル伝達機能(ポリ I:C の細胞内への取り込み機能の可能性を含む)を調節する構造が存在する可能性などが考えられる。この事については今後の課題である。

7. 単クローン抗体による分子レベルでのレセプターの解析

特異的ポリ I:C レセプター分子上の、ポリ I:C 結合部位を認識し、ポリ I:C によるインターフェロン誘発を阻害する単クローン抗体を用いて、ウエスタンブロッティング法により、ポリ I:C レセプター画分の解析を行なった。アフィニティクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーによって分画した RK-13 細胞のポリ I:C レセプター画分を、SDS-PAGE で電気泳動し(図 5)、ポリペプチドのバンドをニトロセルロース膜に転写した後、インターフェロン誘発を阻害する単クローン抗体と反応させた。2次抗体として、ベルオキシダーゼ標識抗体を用いて発色させた所、59K のポリペプチドに一致する特異染色バンドが検出された。即ち、図 5 に認められる 5 種類のポリペプチドのうち、59K の分子量のものが、ポリ I:C 結合部位を構成していると推定される。

考 察

今回の一連の研究によって、インターフェロン誘発に関与する特異的なポリ I:C レセプターが、RK-13 細胞の表層に存在する事が確認され、これを部分精製し、その性状を一部解明する事ができた。筆者らの今後の課題は、このレセプターを更に精製し、より正確な全体の分子量を測定する事及び、インターフェロン産生を増強する単クローン抗体が認識する成分の同定と、その成分の機能の解析を行う事などにより、ポリ I:C によるインターフェロン誘発機構解明の作業を進める事である。

参 考 文 献

(1) ITSUROU YOSHIDA and MASANOBU AZUMA

Adsorption of Poly rI:rC on Cell Membrane Participating and Nonparticipating in Interferon Induction.

J. IFN Res. 5 1~10 (1985)

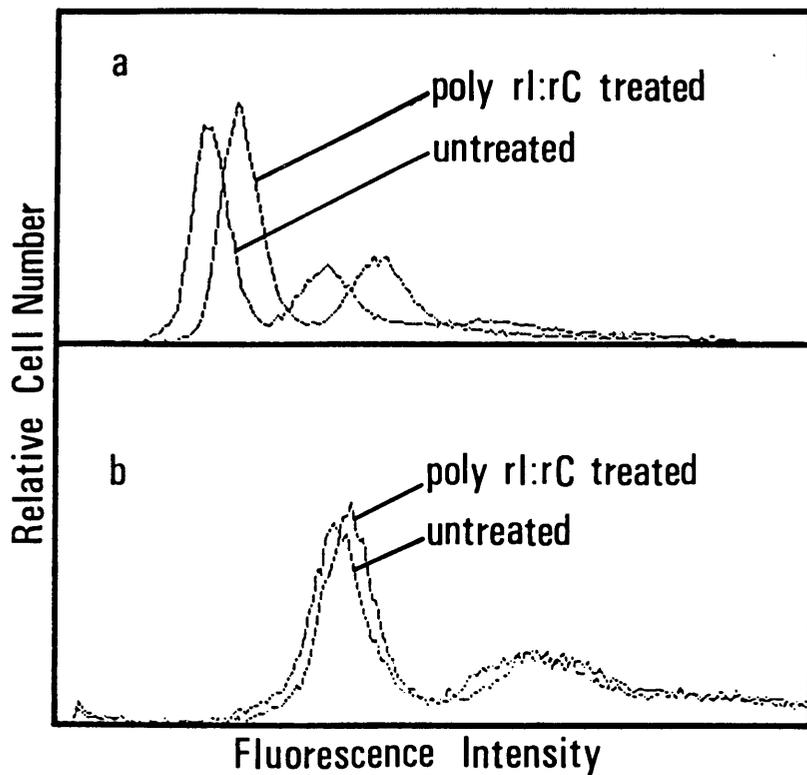


図1. フローサイトメトリーによるポリ I:C 結合量の解析

a = RK-13 細胞 b = PR-RK 細胞

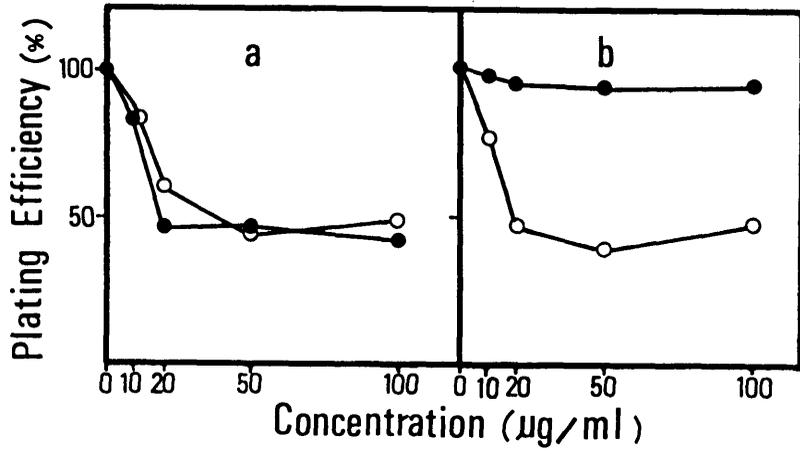


図2. ポリ I:C 及びポリ A:U に対する感受性の比較

a = RK-13 細胞 b = PR-RK 細胞

●—● = ポリ I:C ○—○ = ポリ A:U

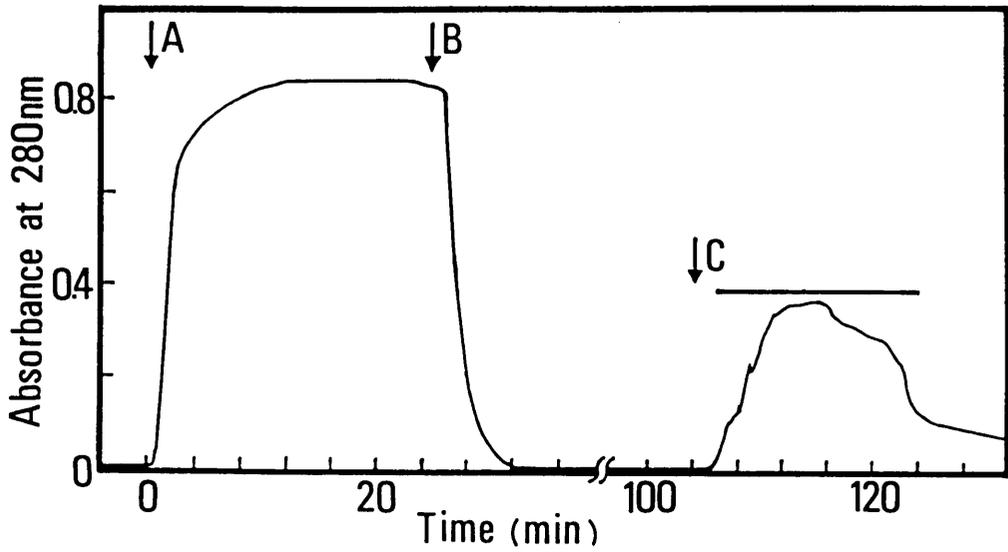


図 3. ポリ I:C アガロースゲルによるアフィニティークロマトグラフィー
 A = 可溶性膜画分 B = PBS C = $1/100 \times$ PBS
 (C の部分をポリ I:C レセプター画分としてプールした。)

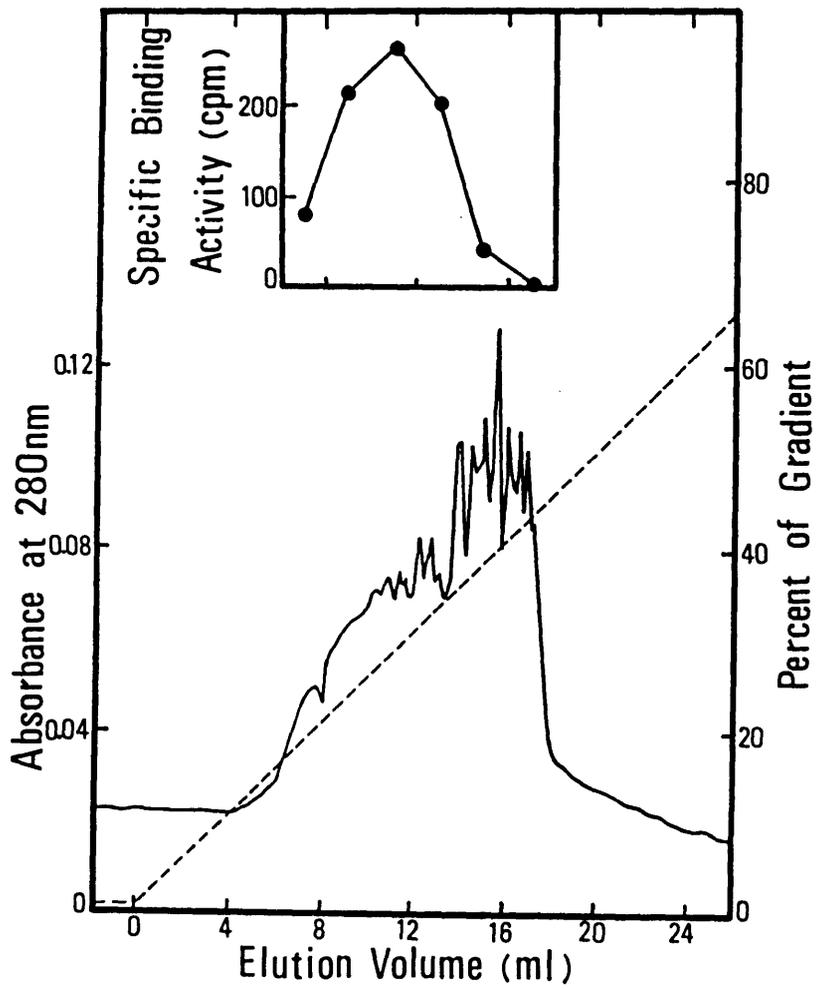


図4. 高速液体クロマトグラフィーによる分画
 図中の検出グラフは、RIAの結果を示す。

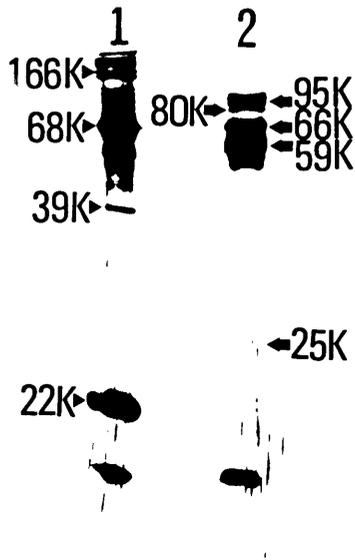


図 5. SDS-PAGEによるポリ I:C レセプターの解析

1 = 分子量マーカー蛋白

2 = ポリ I:C レセプター画分