

博士論文

組み換えニワトリ IL-6 の基礎並びに応用的研究

平成 17 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物資源開発学専攻

西道教尚

目次

第1章		
緒言		1
第2章		
ニワトリハイブリドーマに対する組み換えニワトリ IL-6 の有効性の検討		
2.1 序論		12
2.2 材料と方法		13
2.3 成績		29
2.4 考察		47
第3章		
ニワトリ IL-6 レセプターの解析		
3.1 序論		53
3.2 材料と方法		54
3.3 成績		65
3.4 考察		80
第4章		
ニワトリ IL-6 レセプターの HUC2-13 培養系への活用並びに IL-6 添加による HUC2-13 抗体産生機構の解析		
4.1 序論		86
4.2 材料と方法		88
4.3 成績		109
4.4 考察		130
最終章		
総括		138
謝辞		142
参考文献		143

第1章 緒言

1-1. インターロイキン6 (IL-6) の発見

生体は、分化、増殖およびその恒常性の維持のために、様々なシグナルを細胞間で交換している。特に、免疫系、造血系などにおいて、主要な細胞間シグナル伝達を担う液性因子の一群は、総称してサイトカインと呼ばれている。サイトカインは、標的細胞が産生細胞自身に反応するオートクライン、または近接する細胞に働くパラクラインとして作用し、生体機構等に重要な役割を果たしている。中でも、体液性免疫を担う B および T 細胞の分化や増殖には、インターロイキン (interleukin; IL)-2 [1], IL-4 [2], IL-6 [3] などが大きく関与していることが知られている。特に、ヒト IL-6 は、T 細胞株 Na1 培養上清中から活性化 B 細胞に抗体産生を誘導する因子 (B cell stimulatory factor-2; BSF-2) として単離された [3] が、ほぼ同時期にクローニングされた肝細胞刺激因子 (hepatocyte stimulatory factor; HSF) [4], ハイブリドーマ/プラズマサイトーマ増殖因子 [5], インターフェロン β 2 (IFN β 2) [6] および 26 kDa タンパク質 [7] が全て同一の塩基配列であることが判明し、1987 年のサイトカインワークショップにおいて IL-6 と命名された。現在までのところ、IL-6 は、ヒト以外にマウス、ラット、ウシ、ブタ、ヒツジ、ネコにおいて遺伝子クローニングが成功しており、哺乳類以外の高等動物ではクローニングの報告が無かった。近年、ニワトリにおいて IL-6 相同遺伝子がクローニングされ [8], 組み換えニワトリ IL-6 タンパク質を用いた機能解析により、ニワトリ IL-6 相同分子が哺乳類 IL-6 と類似した生物活性を有していることが報告されている。

1-2. IL-6 の特徴および機能

IL-6 は典型的な多機能性サイトカインであり、上述した以外の代表的な機能として、T 細胞に作用し増殖や細胞傷害性 T 細胞への分化を誘導する [9], 巨核球の成熟を誘導する [10], 肝細胞に急性期タンパク質の産生を誘導する [11], 骨髄性白血病細胞株の増殖を抑制しマクロファージへの分化を誘導する [12], マウスハイブリドーマ/プラズマサイトーマに対して細胞増殖 [5, 13] および抗体産生 [14] を促進するなどが知られている。また、IL-6 は、慢性関節リウマチ [15], メサンギウム増殖性腎炎 [16], クローン病 [17] またはキャッスルマン病 [18] などの免疫疾患の原因因子としても注目されており、IL-6 レセプター (IL-6R) に対するモノクローナル抗体の臨床分野への応用も検討されている [19]。主な IL-6 産生細胞としては、線維芽細胞、単球/マクロファージ、T 細胞、B 細胞、血管内皮細胞、腫瘍細胞および腫瘍

細胞株が知られている。これらの細胞や細胞株では、IL-6 は恒常的に産生される場合と種々の刺激によって産生を誘導される場合とがある。IL-6 産生を誘導する物質としては各種サイトカイン (IL-1, tumor necrosis factor; TNF, platelet-derived growth factor; PDGF, interferon- β ; IFN- β), リポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS), フィトヘムアグルチニン (phytohemagglutinin; PHA), コンカナバリン A (concanavalin A; Con A) およびホルボールエステル (12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TPA) などが報告されている。

1-3. IL-6 の細胞内シグナル伝達機構およびシグナル調節機構

IL-6 の細胞内へのシグナル伝達は、主に janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcript (STAT) および Ras-MAPK 経路によって制御されている (図 1)。はじめに、IL-6 は、IL-6 特異的な IL-6R α と結合後、シグナル伝達レセプターである gp130 と会合してリガンド/レセプター複合体を形成する。IL-6R α および gp130 は、共に I 型サイトカインレセプターファミリーに属しており [20], 両レセプター共に、細胞外領域にレセプターファミリーの特徴であるイムノグロブリン様 (IG)ドメインおよびフィブロネクチン III 型 (FN III) ドメインを有している。中でも、FN III ドメインは、N 末端側に特徴的な 4 つのシステイン残基を、また C 末端側に WSXWS モチーフ [21] を有しており、リガンドとの結合に関与する領域 (cytokine binding module; CBM) として重要である。両レセプターの内、IL-6R α は細胞内領域にチロシンキナーゼドメインを持っていない [22] ことから、シグナル伝達能力を全く欠如しており、シグナル伝達は、もう一つのレセプターである gp130 により行われる。gp130 は、IL-6 をはじめとして IL-11, 白血病阻止因子 (leukemia inhibitory factor; LIF), オンコスタチン M (oncostatin M; OSM), 毛様体神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor; CNTF), カルディオトロフィン 1 (cardiotrophin-1; CT-1) およびカルディオトロフィン様サイトカイン (cardiotrophin-like cytokine; CLC) から形成される、IL-6 サイトカインファミリーの共通シグナル伝達レセプターとして用いられる。これまで、IL-6 におけるリガンド/レセプター複合体は、IL-6/IL-6Ra/(gp130)₂ からなる 4 量体形成説が有力であったが、最近、結晶構造解析により、この複合体は (IL-6/IL-6Ra/gp130)₂ からなる 6 量体であることが報告されている [23]。また、IL-6R α に関しては、オルタナティブスプライシングにより可溶性 IL-6R (sIL-6R) が発現することが報告されている [24] が、この sIL-6R も通常の膜結合型と同様に、リガンド/レセプター複合体を形成して細胞内にシグナルを伝達することが可能である。複合体形成後の gp130 には、JAK1, JAK2 または tyrosine kinase-2 (TYK2) が会合することでチロシン残基のリン酸化 (活性化) が起こり、この活性化が引き金となって下流の STAT タン

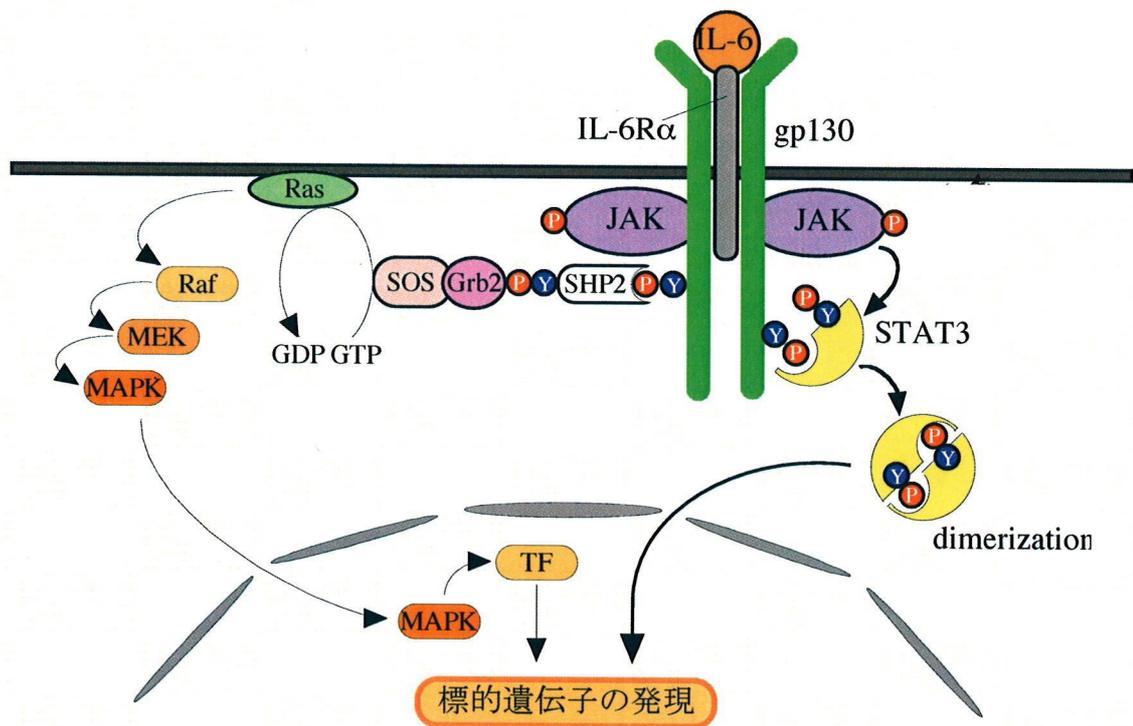


図1. IL-6 による細胞内シグナル伝達の模式図

パク質のチロシン残基のリン酸化を引き起こす [25]. 哺乳類において STAT ファミリーは STAT1, 2, 3 (α , β), 4, 5 (α , β) および 6 の 8 種類が存在することが知られているが, サイトカインの種類によってシグナル伝達を担う STAT タンパク質は異なっており, IL-6 のシグナルでは STAT1 および STAT3 が使用されている. リン酸化した STAT1 および STAT3 は, 相手方のリン酸基と自身が持つ SH2 ドメインを介してホモまたはヘテロ二量体を形成し, 核内に移行して標的遺伝子上の STAT3 特異的な結合配列 (acute-phase response element; APRE) に結合して遺伝子発現を誘導する. 特に STAT3 は, IL-6 のシグナル伝達経路において必須の転写因子であることが, STAT3 ノックアウトマウスを用いた研究により証明されている [26]. STAT3 には, 727 番目のセリン残基 (Ser⁷²⁷) も IL-6 の刺激によりリン酸化されることが報告されている. Ser⁷²⁷ のリン酸化による効果は, STAT3 の遺伝子転写活性を高めるといった報告 [27] もあるが, 現在のところ詳細は不明である. 一方, Ras-MAPK (mitogen- activated protein kinase) 経路は, JAK によって活性化した gp130 の 759 番目のチロシン残基 (Tyr⁷⁵⁹) に SHP2 (SH2-domain-containing tyrosine phosphatase) が会合, リン酸化した後に, Grb2-SOS (growth factor-receptor-bound factor/Son of sevenless) 複合体が結合する. Grb2-SOS 複合体は Ras の活性化を誘導し, 以降 Raf, MEK および MAPK が次々にリン酸化されてシグナル伝達が行われる. この Ras-MAPK 経路は, IL-6 以外にも様々なサイトカインや増殖因子が用いるシグナル伝達経路として知られている.

ところで, 生体は, 過剰シグナルの持続状態を防止するために, 精巧なシグナル抑制機構を有している. JAK/STAT シグナル経路においても, 特徴的な「シグナル抑制因子」が存在し, シグナルの減衰や調整, いわゆる「負の調節」を行うことで, 細胞の恒常性を維持している (図 2). SHP2 は PTPs (protein tyrosine phosphatase) ファミリーに属する脱リン酸化酵素で, 活性化した gp130 の Tyr⁷⁵⁹ に会合するが, ドミナントネガティブ変異体を用いた試験の結果, SHP2 は gp130, JAK, STAT および SHP2 自身の全ての脱リン酸化に関与していることが判明している [28]. また, 先にも述べたように SHP2 は Ras-MAPK 経路の活性化因子として機能しており, JAK/STAT 経路の抑制と合わせて考えると, SHP2 は Ras-MAPK 経路の活性化を通して JAK/STAT 経路の抑制を行っていると考えられる. SOCS (suppressor of cytokine signaling) [29] は, JAK/STAT シグナル経路によって発現が誘導されるフィードバック阻害因子で, JAK に作用することで, JAK およびその下流の gp130, STAT のリン酸化を阻害する. SOCS ファミリーは現在までに 8 種類 (CIS, SOCS1-SOCS7) の存在が報告されているが, IL-6 ファミリーサイトカインのシグナル伝達系では, SOCS1 および SOCS3 が重要な役割を担っていることが知られている [29, 30]. SOCS3 は, 活性化した gp130 の Tyr⁷⁵⁹ に結合することが知られている [31] が, この部位には, 先にも述べたように SHP2 も会合することが報告されている. 同一の部位に二種類

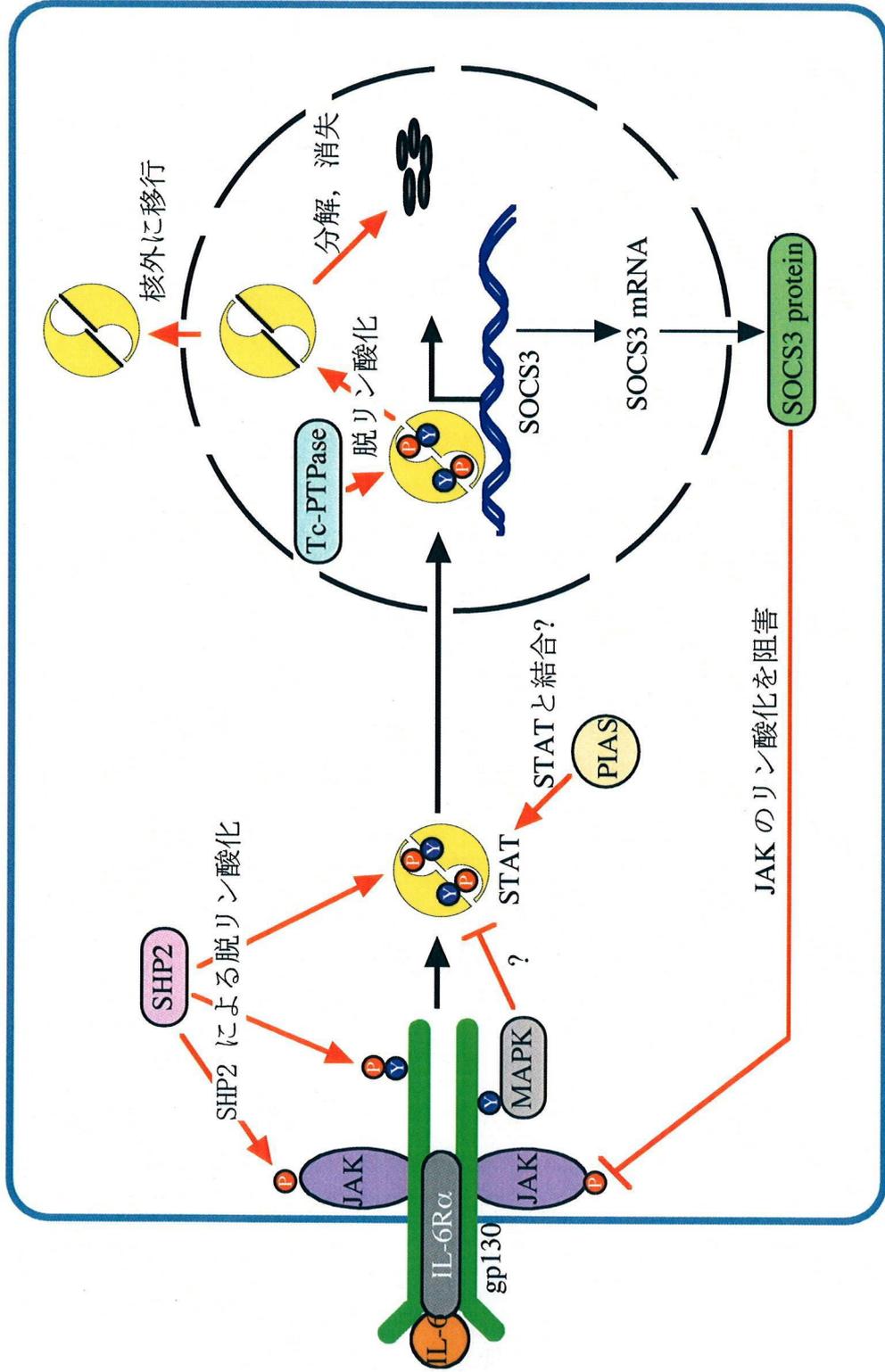


図2. IL-6 シグナル伝達時における「負の制御」の模式図

先にも述べたように SHP2 も会合することが報告されている。同一の部位に二種類のタンパク質が会合する原因は不明であるが、いずれも JAK/STAT シグナル伝達を阻害する因子であることから、シグナル伝達阻害機構における Tyr⁷⁵⁹の重要性が示唆されている。また、PIAS (protein inhibitor of activated STAT) は、主に細胞質で作用するシグナル抑制因子で、哺乳類では現在までに 5 種類 (PIAS1, 3, x α , x β および y) の存在が確認されている。この内、IL-6 のシグナル伝達系には PIAS3 が関与することが報告されており [32], STAT3 による遺伝子発現を抑制している。PIAS3 の JAK/STAT シグナル伝達阻害機構は、チロシン残基のリン酸化した STAT3 に直接作用 (結合) することで、STAT3 の標的 DNA への結合を阻害することが報告されている [32] が、PIAS の種類によっては STAT の発現そのものを転写レベルで抑制している可能性も示唆されており、完全に解明されていないのが現状である。

1-4. IL-6 添加時の B 細胞 (抗体産生細胞) における抗体産生機構

哺乳類では、イムノグロブリンの合成および分泌は、抗原感作や IL-6 などのサイトカインによって促進されるが、特に IL-6 のシグナルは、イムノグロブリンの産生を転写レベルで制御していることが報告されている [68]. IL-6 による標的遺伝子の転写を制御する転写因子の一つとして C/EBP ファミリーが知られている [98]. 哺乳類において、C/EBP ファミリーは現在 6 種類 (α , β , γ , δ , ϵ および ζ) が報告されているが、特に成熟 B 細胞では C/EBP β および C/EBP γ が発現している [99]. C/EBP γ は、様々な組織や細胞株で発現が確認されているが、タンパクレベルでの発現は未分化 B 細胞で特に認められる [100]. また、N 末端側に C/EBP ファミリーに特徴的な転写活性ドメインを有しておらず、他の活性型 C/EBP とヘテロ二量体を形成して転写活性を阻害することが報告されている。それに対して、C/EBP β は B 細胞の分化・成熟に伴って発現量が上昇することが報告されている [99]. 未熟 B 細胞が抗体産生 B 細胞へと分化していく過程は、IL-6 のシグナルや抗原感作により転写を促進する C/EBP β の発現量が増加し、転写を抑制する C/EBP γ の発現量を上回ることにより起きていると考えられる。また、小胞体内シャペロンである BiP は、小胞体内に移行した重鎖と軽鎖の正確なフォールディングに関与し、正確な抗体分子の形成を促す [101]. このように、抗体分子の合成・分泌における機構が哺乳類では明らかになりつつある。

1-5. 細胞融合法によるモノクローナル抗体の作出とその特徴

1950 年代後半に Okada [33] らにより見いだされたウイルスによる細胞融合の現象

は、体細胞遺伝学や免疫学の領域において大きな発展をもたらした。その後、1975 年に Kohler と Milstein はこの手法を応用し、*in vitro* で永続培養が不可能である抗体産生 B 細胞と、永続培養が可能であるマウスミエローマ細胞株を融合させることにより、*in vitro* で増殖可能で、特定の抗体を産生し続けるマウス B 細胞ハイブリドーマを作製し、免疫学の分野における細胞融合法を確立した [34]。このハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体は、従来使用されてきたポリクローナル抗体 (抗血清) と比較して幾つかの優れた点がある。ポリクローナル抗体は、(1) 抗体価が低い、(2) 種々の抗原決定基に対する抗体を含むので特異性が不明瞭である、(3) 精製抗原を用いなければ目的の抗体を獲得することが困難である、(4) 供給量に限界があり、また同一の抗体 (ロット) を供給することが困難である、などの問題点を有する。一方、モノクローナル抗体は、ポリクローナル抗体の持つ上記の問題点を克服し、(1) 生化学的および生物学的に単一の性質を持ったただ一つの抗原決定基に対する抗体の作出が可能である、(2) 同一の化学構造を持つ抗体を永続的に供給することが可能である、(3) 非精製抗原を用いても特異的抗体の獲得が可能である、などの長所がある。モノクローナル抗体作製技術は、主としてマウスを実験対象として開発され、以降、細胞融合法に有用な親細胞株 (マウスミエローマまたは B 細胞株) が数多く開発され、モノクローナル抗体作製技術の進歩を促した。これまでに、数多くのマウス型モノクローナル抗体が作製され、試薬および臨床検査など幅広い分野で用いられている。しかし、哺乳類間で高度保存されたタンパク質に対する抗体を作製する場合、これらのタンパク質はその相同性の高さ故にマウスに免疫原性を発揮する能力が非常に乏しく、有用な抗体が作出できないといった問題点を抱えている。マウスに代わる免疫動物としては、主にウサギやヤギが用いられるが、両動物共にポリクローナル抗体が主であり、近年ウサギにおいても細胞融合用親株の樹立が報告されている [35] が、ウサギ型モノクローナル抗体の本格的な実用化には至っていないのが現状である。

1-6. ニワトリ型モノクローナル抗体の特徴とその有用性

一方、ニワトリでは、産卵ニワトリの移行抗体を利用し卵黄中のポリクローナル抗体を作製する技術が注目されていた。抗原を免疫したニワトリの産む卵の卵黄中には特異抗体を含めて多くの IgY が存在するが、卵黄を構成するタンパク質がごく僅かであることから、種々のクラスの抗体やタンパク質が混在する哺乳類の血清と比較して、抗体の精製が容易である。また、卵黄中に含まれる IgY の量は極めて多く [36, 37]、1 羽のニワトリから得られる特異抗体の量はウサギなどと比較すると大量に得ることができる。このような利点を活かし、最近、精製卵黄抗体の市場展開

も起こりつつある。また、ニワトリ免疫グロブリンは次のような特徴を有する。すなわち、(1) 哺乳類由来免疫抗原に対するニワトリ抗体は、同免疫抗原に対する哺乳類抗体に比べて非特異的反応 (バックグラウンド) が極めて低い [38], (2) ニワトリ IgY はプロテイン A やプロテイン G に親和性を持たない [39], (3) ニワトリ IgY は哺乳類の補体を活性化しない [40], などである。そして、特に哺乳類間で高度保存されている分子に対する抗体を作製するためには、系統発生的に哺乳類と異なり、かつ哺乳類とは異なる独自の高度な免疫システムを持つ鳥類が優れていることが挙げられる。ニワトリにおけるこれらの利点を考えた場合、もしニワトリ型モノクローナル抗体の作製が可能となれば、ニワトリ抗体の有用性および汎用性は飛躍的に拡大するものと考えられた。

そこで当研究室は、ニワトリ型モノクローナル抗体の作製を目的として、1989 年に Nishinaka ら [41] によって Thymidine Kinase (TK) 欠損ニワトリ B リンパ球細胞株の確立に成功し、この細胞株を親株とした細胞融合法により、特異抗体産生ニワトリ B 細胞ハイブリドーマを作出し、ニワトリ型モノクローナル抗体の応用への道を拓いた。先にも述べたように、ニワトリは系統発生的に哺乳類とは異なる動物であることから、哺乳類間で高度保存されているタンパク質であってもニワトリでは相同性の低い場合が多い。例えば、ウシにおける牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy; BSE) やヒツジにおけるスクレイピー、そしてヒトにおけるクロイツフェルトヤコブ病 (Creutzfeldt-Jacob disease; CJD) などの原因タンパク質であるプリオンタンパク質 (prion protein; PrP) [42] は、哺乳類間におけるアミノ酸の相同性が 80-90% 台と非常に高いことから、マウス等において優良なモノクローナル抗体の作製が困難であり、PrP ノックアウトマウスを用いてようやくモノクローナル抗体の作製が可能となっている。しかし、ニワトリ PrP のアミノ酸配列は、哺乳類 PrP のアミノ酸配列と約 40%の相同性と低い [43] ことから、当研究室の Matsuda ら [44] および Nakamura ら [45, 46, 47] が哺乳類プリオンタンパク質に対して高感度であり、かつ非特異反応の極めて低いニワトリ型モノクローナル抗体の作製に成功している。また、Asaoka ら [48] は、腫瘍マーカーである Hangarniz-Deicher antigen (HD 抗原) に対するモノクローナル抗体の作製を報告しており、免疫動物としてのニワトリの有用性と、ニワトリ型モノクローナル抗体の優良性がうかがえる。最近ではウシ I 型コラーゲン中に含まれるアレルゲン活性部位に対するモノクローナル抗体の作出を行う [49] など、今後ニワトリ抗体を診断薬や検査薬として活用する道も拓かれることが期待されている。

1-7. ニワトリハイブリドーマの抱える問題点と IL-6 への注目

このように有用なニワトリモノクローナル抗体産生ハイブリドーマであるが、その応用範囲をさらに広げるためには、細胞の安定した増殖と更なる抗体産生が必要と考えられている。特に、抗体産生能に関しては、マウス型は一般的に 1 日当たり約 $10 \mu\text{g/ml}/1 \times 10^6$ 細胞であるのに対して、ニワトリ型が約 $1 \mu\text{g/ml}/1 \times 10^6$ 細胞と、マウス型の 1/10 の抗体産生能であることが知られており、この問題がニワトリハイブリドーマ由来モノクローナル抗体の大量調整を困難にしている。また、ニワトリでは腹水抗体の作製も現在のところ困難であることから、現在、ニワトリ型モノクローナル抗体の大量調整は、遺伝子工学技術であるファージディスプレイ法 [50] を活用した大腸菌発現組み換え単鎖型抗体 (single chain Fragment of variable region; scFv) の作製が主となっている。scFv 抗体は、確かにニワトリ型モノクローナル抗体の大量調整を可能にしたが、単鎖型であるが故に二価の抗体よりも抗原に対する親和性が著しく低下するものが存在する (当研究室の未発表データ)。また、同一抗原に対するモノクローナル抗体のスクリーニングの過程で用いられるパニング操作では、その操作の性質上の原因により、性質のほぼ等しいクローンが回収される傾向があることから、scFv 抗体のみではニワトリ型モノクローナル抗体の全てをカバーすることはできない。そのため、ハイブリドーマの産生するネイティブ型モノクローナル抗体は、今後も重要な位置を占めることが容易に想像される。そこで、ニワトリハイブリドーマの抗体産生能そのものを上昇させる手段として、ニワトリハイブリドーマの培養系に有用な因子を活用することが考えられた。そこで筆者は、マウス IL-6 がマウスハイブリドーマの培養系に有効利用されていることに着目した。先にも述べたように、哺乳類において IL-6 は、ハイブリドーマの細胞増殖や抗体産生を促進する効果があることから、マウスハイブリドーマの汎用性拡大に貢献した経緯を持つ。このことから、もしニワトリ IL-6 がニワトリハイブリドーマに対してマウスで認められる効果を発揮すれば、ニワトリハイブリドーマの抱える弱点を克服し、ニワトリ型モノクローナル抗体の汎用性拡大に貢献できると考えた。

1-8. 本研究の目的と構成

そこで本研究では、ニワトリハイブリドーマ培養系にニワトリ IL-6 を活用することを目的として、第一の研究では、組み換えニワトリ IL-6 を作製し、ニワトリハイブリドーマ HUC2-13 [44] に対する生物活性試験を実施し、ニワトリハイブリドーマに対する有効性を検討した。続いて、ニワトリ IL-6 の特異的受容体であるニワトリ IL-6R のクローニングを行い、特にニワトリハイブリドーマに注目して種々のニワトリ組織および細胞株における発現解析を行った。最後に、可溶性 IL-6R のニワトリハイブリドーマ培養系への活用法の一つとして、ニワトリ IL-6R とニワトリ IL-6 の

融合タンパク質 (Hyper-chIL-6) を作製し、ニワトリ IL-6 単独添加条件との活性比較 (リン酸化 STAT3 の検出) を行うと共に、chIL-6 添加時における HUC2-13 内抗体遺伝子およびその発現の制御に関連すると考えられる遺伝子の発現を解析することで、chIL-6 添加時の HUC2-13 におけるモノクローナル抗体産生機構の解明を試みた。

第 2 章

ニワトリハイブリドーマに対する組み換えニワトリ IL-6 の有効性の検討

2.1 序論

現在、広範囲に渡って活用されているマウスハイブリドーマは、細胞融合時において、血清成分のみではハイブリドーマの増殖が十分に得られないといった問題点を抱えていた。その際、マウス線維芽細胞などの支持細胞の存在下でハイブリドーマの増殖効率が改善されることが報告され、支持細胞の産生する液性因子（サイトカイン）がハイブリドーマの有効な増殖因子であることが示唆された。後の解析により、この液性因子が IL-6 であることが判明し、IL-6 がマウスハイブリドーマ培養系における有用因子として、その培養系に活用されるようになった。また、樹立後のハイブリドーマに対しても、IL-6 は抗体産生を促進する効果があることから、IL-6 は、マウスハイブリドーマの培養系において非常に有用なサイトカインであるといえる。

近年、ニワトリにおいて哺乳類 IL-6 相同分子の遺伝子クローニングが報告され、組み換えニワトリ IL-6 を用いた種々の活性試験により、ニワトリ IL-6 が哺乳類 IL-6 と類似した生物活性を有することが判明した。このことから、ニワトリ IL-6 がニワトリハイブリドーマに対して、安定した増殖や抗体産生の向上に有効であれば、ニワトリハイブリドーマが現在抱えている諸問題を解決し、汎用性の拡大に寄与する可能性が考えられた。

そこで本章では、ニワトリ IL-6 のニワトリハイブリドーマ培養系への活用を目的として、ニワトリ IL-6 の原核型および真核型組み換えタンパク質を作製し、ニワトリハイブリドーマ HUC2-13 に対する細胞増殖活性および抗体産生促進活性を測定し、その有効性を検討した。また、IL-6 の主要なシグナル伝達経路である JAK/STAT 経路および Ras-MAPK 経路に着目し、各経路のシグナル伝達分子である STAT3 および MAPKK (MEK1/2) のリン酸化を検出することで、IL-6 添加によるハイブリドーマへの有用性を検討した。

2.2 材料と方法

(1) 供試細胞株および供試動物

細胞株は、ニワトリマクロファージ様細胞株 HD11 [51], 本研究室で樹立されたヒト PrP に対するモノクローナル抗体産生ニワトリハイブリドーマ HUC2-13 [44], 大阪大学平野研より分与を受けた IL-6 依存性マウスハイブリドーマ MH60 [52], HGPRT 欠損マウス細胞融合用親株 SP2/O-Ag 14 (SP2) [53], アフリカミドリザル腎細胞株 COS-7 およびチャイニーズハムスター卵巣細胞株 CHO-K1 [54] を供試した. HD11 及び HUC2-13 は, 10% 牛胎児血清 (fetal bovine serum; FBS, SIGMA) 添加イスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's modified Dulbecco's medium; IMDM, Invitrogen) 中で, 38.5°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養維持した. MH60 および SP2 は, 10% FBS 加 IMDM 中で, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養維持した. COS-7 は, 10% FBS 添加ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM, Invitrogen) 中で, また CHO-K1 は, 10% FBS 添加 F-12 Nutrient Mixture (HAM, Invitrogen) 中で, それぞれ 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養維持した.

また, chIL-6 に対するモノクローナル抗体の作製を目的として, 8 週齢の BALB/c マウスを免疫動物として供試した.

(2) 大腸菌発現組み換え chIL-6 の作製

大腸菌発現組み換え chIL-6 (以降, 原核型 rchIL-6 と記す) の作製は, 大腸菌用発現ベクターである pGEX-6P-1 (Amasham Biosciences) を発現ベクターとして用いた. pGEX-6P-1 は, マルチクローニングサイト (MCS) の 5' 上流にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) をコードする遺伝子が付加されており, GST 融合タンパク質として発現する. 発現後の融合タンパク質は, GST と目的タンパクの介在配列を特異的に認識する酵素で処理することで, 目的の組み換えタンパク質から GST を除去することができる.

a. 全 RNA の抽出

全 RNA は, 10 µg/ml LPS (E coli 0127: B8, DIFCO LABORATORIES) 添加無血清 IMDM 中で 4 時間刺激培養した HD11 から TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて, キット添付のプロトコルに従って抽出した. 抽出後の全 RNA は, 表 1 に示す組成で DNase 処理し, 残存する DNA を完全に除去した.

b. 逆転写反応による cDNA の合成

逆転写反応は, SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて行った. a で抽出した全 RNA 2 μg に対して, 0.5 μg の oligo (dT)₁₅ プライマー (Roche) を加えた後, distilled water (DW) で 15.5 μl に調製し, 65°C で 5 分間熱変性を行った. 熱変性後の混合液は, 直ちに氷中で 1 分間冷却した後, 表 2 に示す組成で 50°C で 40 分間逆転写反応を行った後, 70°C で 15 分間熱処理を行って反応を停止した. さらに, 10 U/ μl RNaseH (TOYOBO) を 1 μl 加えて 37°C で 20 分間加温し, RNA を分解除去した. 合成した cDNA は使用時まで -20°C で保存した.

c. chIL-6 遺伝子の増幅

chIL-6 遺伝子は, Advantage GC2 polymerase (Clontech) を用いた PCR 法により増幅した. 成熟型 chIL-6 をコードする領域を増幅するために, chIL-6 の塩基配列 (NCBI accession number AJ309540) を元にプライマーを作製し (chIL-6-F, chIL-6-R), 作製した各プライマーの 5' 末端には, タンパク質発現ベクターの MCS へのライゲーションを考慮して, それぞれ *Bam*H I および *Xho* I の制限酵素部位を付加した. PCR 反応は, 本章の材料と方法 (2)-b で合成した cDNA を鋳型として, 94°C, 3 分間の加熱の後に, 94°C, 30 秒間 (熱変性), 60°C, 30 秒間 (プライマーのアニーリング) および 68°C, 3 分間 (伸長反応) を 1 サイクルとして 30 サイクル行い, 最後に 68°C, 3 分間反応させた. サーマルサイクラーは, PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research) を使用した. なお, プライマーの塩基配列は表 3 に, PCR の反応液組成は表 4 に示した.

d. TA クローニング法による chIL-6 遺伝子のクローニング

c で増幅した遺伝子断片は, Gel extraction kit (QIAGEN) を用いて精製した. 前述の PCR 反応液を 1% アガロースゲル (TAKARA) 中で電気泳動した後, ゲルを 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ エチジウムブロマイド (EtBr) 含トリス酢酸 EDTA 緩衝液 (Tris-Acetate EDTA; TAE) 中で 30 分間染色した. 染色後, ゲルは TAE 中で 10 分間洗浄し, 紫外光下において目的のバンドを切り出した. 切り出したバンドは, Gel extraction kit を用い, キット添付のプロトコルに従って精製した. 精製した遺伝子断片は, Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences) を用いて濃度を測定後, クローニング用ベクターである pGEM-T Easy vector (Promega) へ TA クローニングした. なお, TA クローニングは, ベクターとインサートのモル比が 1 対 3 になるように調製し, キット添付の

表1. DNase 処理の反応液組成

組成	容量 (μl)
10 x DNase I-RNase free buffer	10.0
DNase I (5 U/ml)	1.0
RNase inhibitor (40 U/ml)	1.0
RNA/DW mixture	88.0
計	100.0

表2. 1 st strand cDNA 合成の反応液組成

組成	容量 (μl)
5 x first strand buffer	5.0
0.1 M DTT	1.0
2.5 mM dNTPs	4.0
RNase inhibitor (40 U/μl)	1.0
RNA/Oligo (dT) primer mixture	9.0
計	20.0

表3. 本章で使用したプライマーの塩基配列

primer	sequence	T _m (°C)
GST-chIL6-F	5'-CCGGATCCCCGCTGCCCCGCCGCCGCGGAC-3' <i>Bam</i> H I	70
GST-chIL6-R	5'-CGCTCGAGTCAGGCACTGAAACTCCTGGT-3' <i>Xho</i> I	68
pSeq-chIL6-F	5'-CGCCATGGCCGCTGCCCCGCCGCCGCG-3' <i>Hind</i> III	60
pSeq-chIL6-R	5'-CGCTCGAGGCACTGAAACTCCTGGT-3' <i>Xho</i> I	58
M13-21	5'-TTGGGTAAACGCCAGGGT-3'	54
M13-R	5'-CTTGGCGTAATCATGGT-3'	50
pSeq-F	5'-CCACCATGGAGACAGACACACT-3'	66
pSeq-R	5'-GGGGGAGGGGCAAACAACAGAT-3'	74

表4. 原核型rchIL-6 のPCR 反応液組成

組成	容量 (μl)
5 x Advantage GC-2 buffer	5.0
2 mM dNTPs	2.5
GC Melt	7.5
GST-chIL6-F (10 μM)	1.0
GST-chIL6-R (10 μM)	1.0
LPS 4 h-stimulated HD11 cDNA (10 ng/μl)	4.0
Advantage GC-2 polymerase	0.5
DW	3.5
計	25.0

プロトコルに従って行った。ライゲーション後の反応液は、宿主大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (TOYOBO) に対して 1/10 量を加えた後に、氷中で 20 分間静置した。続いて混合液は、42°C で 50 秒間加温して再び氷中で 2 分間急冷した。急冷後、混合液に SOC 培地を 1 ml 添加して 37°C で 30 分間振盪培養し、この培養液 80 μ l を 100 μ g/ml アンピシリン含 2x YT プレートに塗布し、37°C で終夜培養した。出現したコロニーが、chIL-6 遺伝子を保有しているか否かを確認するために、M13-F および M13-R プライマーを用いたコロニーPCR を行った。なお、各 M13 プライマーの塩基配列は表 3 に示した。終夜培養後、出現したコロニーを無作為に爪楊枝でかきとり、表 5 の PCR 反応液に攪拌した。PCR 反応は、94°C、3 分間の加熱の後に、94°C、1 分間 (熱変性)、50°C、30 秒間 (プライマーのアニーリング) および 72°C、2 分間 (伸長反応) を 1 サイクルとして 30 サイクル行い、最後に 72°C、5 分間反応させた。サーマルサイクラーは、PTC-100 Programmable Thermal Controller を使用した。反応終了後の PCR 反応液は、1% アガロースゲル中で電気泳動後、1 μ g/ml EtBr 含 TAE 中で 30 分間染色した。染色後、ゲルは TAE 中で 10 分間洗浄し、紫外光下においてバンドを検出した。目的遺伝子の保有が認められたコロニーは、100 μ g/ml アンピシリン含 2x YT 培地 2 ml 中で、37°C で終夜振盪培養した。培養後の大腸菌からのプラスミド DNA の抽出は、QIAprep spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用い、キット添付のプロトコルに従って行った。抽出したプラスミド DNA は、Big Dye terminator ver. 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) および M13 プライマーを用い、キット添付のプロトコルに従ってシーケンス反応を行った。シーケンスの反応組成は、表 6 に示し、以降の実験中に出てくるシーケンス反応は、すべて表 6 に準じて行った。最後に、塩基配列は、3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) を用いて、機器添付のプロトコルに従って決定し、得られた塩基配列は、GENETYX-MAC ver. 9.0 (Software Development) を用いて、登録されている chIL-6 遺伝子との相同性検索を行った。

e. 原核型 rchIL-6 タンパク質発現ベクターの作製

正確な chIL-6 遺伝子が組み込まれたプラスミド DNA は、*Bam*H I および *Xho* I で制限酵素処理した後、1% アガロースゲル中で電気泳動して、ゲルを 1 μ g/ml EtBr 含 TAE 中で 30 分間染色した。染色後、ゲルは TAE 中で 10 分間洗浄し、紫外光下において chIL-6 遺伝子断片を切り出した。切り出したバンドは、Gel extraction kit を用い、キット添付のプロトコルに従って精製した。また、組み換えタンパク質発現ベクターである pGEX-6P-1 も同様に *Bam*H I および *Xho* I で制限酵素処理後に精製し、Ligation High ligation kit (TOYOBO) を用いて、キット添付のプロトコルに従って chIL-6 遺伝子と pGEX-6P-1 をライゲーションした。ライゲーション後の反応

表5. コロニーPCR の反応液組成

組成	容量 (μl)
10 x Ex taq buffer	2.5
2.5 mM dNTPs	2.5
M13-21/pSeq-F (10 μM)	1.0
M13-R/pSeq-R (10 μM)	1.0
Ex taq (5 U/μl)	0.5
DW	17.5
計	25.0

表6. サイクルシーケンスの反応液組成

組成	容量 (μl)
Bigdye terminator ver. 3.1	2.0
5 x sequencing buffer	3.0
sequencing primer (3.2 μM)	1.0
DNA*/DW mixture	14.0
計	20.0

* plasmid DNA; 200-500 ng
 PCR product; 2-10 ng (~300 bp)
 10-40 ng (~1000 bp)

液は、宿主大腸菌 BL21 (DE3) コンピテント細胞 (TAKARA) に対して 1/10 量を加えた後に、氷中で 45 分間静置した。続いて混合液は、42°C で 2 分間加温して再び氷中で 2 分間急冷した。急冷後、混合液に LB 培地を 500 μ l 添加して 37°C で 1 時間振盪培養し、この培養液 80 μ l を 100 μ g/ml アンピシリン含 LB プレートに塗布して 37°C で 12 時間培養した。培養後に出現した単一コロニーは、100 μ g/ml アンピシリン含 LB 培地中で、37°C で終夜振盪培養し、培養後の大腸菌からのプラスミド DNA の抽出を QIAprep spin Miniprep Kit を用いて行った後に、*Bam*H I および *Xho* I で制限酵素処理を行い、アガロース電気泳動により *chIL-6* 遺伝子断片の確認を行った。

f. 大腸菌内での原核型 *rchIL-6* タンパク質の発現

遺伝子断片の確認ができたコロニーは、再度 2 ml の 100 μ g/ml アンピシリン含 LB 培地中で、37°C で終夜振盪培養した。翌日、培養液の内 100 μ l を、10 ml (4 本) の 100 μ g/ml アンピシリン含 LB 培地に植え継ぎ、培養液の 600 nm の吸光度の値が 0.8 になるまで 37°C で振盪培養した。続いて、この培養液 5 ml を 500 ml (8 本分) の 100 μ g/ml アンピシリン含 LB 培地に植え継ぎ、培養液の 600 nm の吸光度の値が 0.8 になるまで 30°C で旋回培養した。原核型 *rchIL-6* タンパク質の発現誘導は、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; IPTG) の終濃度が 0.1 mM になるように添加して、25°C で更に 4 時間旋回培養した。培養後、3,300 x g で 15 分間の遠心により菌体を全て回収して、培地を完全に除去した。培地を除去した後の菌体は、0.5% CHAPS (ナカライテスク) 含リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline; PBS) 50 ml に再懸濁し、SONIFIER250D (Branson) を用いた超音波処理により破碎した。破碎後の菌体懸濁液は、6,000 x g で 10 分間遠心して上清と沈殿に分離し、上清を回収した。回収した上清は、使用時まで -20°C で保存した。

g. 原核型 *rchIL-6* タンパク質の精製

原核型 *rchIL-6* タンパク質の精製は、N 末端に付加される GST とグルタチオンの親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーを行い、カラム上において酵素処理を施して原核型 *rchIL-6* のみを溶出させた後に、陰イオン交換クロマトグラフィーによってさらに精製した。

f. で回収した上清には、ジチオスレイトール (dithiothreitol; DTT) の終濃度が 5 mM になるように添加した後、グルタチオン・セファロース 4B (Amersham Biosciences) 4 ml と混合して、4°C で終夜混和した。この混合液は、カラム (PD-10 empty, Amersham Biosciences) に添加した後、PBS 40 ml および酵素反応緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH

7.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 1mM DTT] 40 ml を用いて洗浄した。続いて, GST と目的タンパク質の介在配列に特異的な 4% Precision Protease (Amersham Biosciences) 含酵素反応緩衝液 4 ml をカラムに添加し, 4°C で 16 時間緩やかに攪拌しながら酵素処理した。

酵素処理後, 溶出液は 20 mM Tris, bis-Tris propane (pH 8.0) で終夜透析した後に, Vision Workstation (PerSeptive Biosystems) および POROS HQ 陰イオン交換カラム (PerSeptive Biosystems) を用いて, すべての使用バッファーが pH 8.0 の条件下で, 機器添付のプロトコルに従って陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。クロマトグラフィー終了後に回収した溶出分画は, PBS に終夜透析した後, SDS-PAGE に供試して目的タンパク質が溶出されていることを確認した。最終的なリコンビナントタンパク質のタンパク濃度は, BCA Protein Assay Kit (PIERCE) を用いて, キット添付のプロトコルに従って測定した。濃度測定後, 精製分画は, 使用時まで -20°C で保存した。

(3) 抗 chIL-6 モノクローナル抗体の作製

抗 chIL-6 モノクローナル抗体は, マウス免疫脾臓リンパ球と, マウス細胞融合用親株 SP2 を用いた細胞融合法により作製した。

a. 免疫

免疫は, 本章の材料と方法 (2)-g で精製した原核型 rchIL-6 20 µg を, マウスの腹腔内に 2 週間おきに注射して, 細胞融合時まで計 4 回注射した。

b. 脾臓リンパ球および融合用親株の調製

最終免疫 3 日後にマウスから脾臓を摘出し, クリーンベンチ内で脾膜や脂肪成分を無菌的に除去した後, 滅菌したハサミで脾臓を細切した。細切後の脾臓は, スライドグラスを用いてさらに細かくすり潰した後に無血清 IMDM に懸濁し, セルフィルターに通して不純物を除去してリンパ球を回収した。回収したリンパ球中の赤血球は, 赤血球破壊酵素 (red blood cell destroy enzyme, RDE) を加えて, 4°C で 5 分間反応させることで除去した。赤血球除去後のリンパ球は, 無血清 IMDM で 3 回遠心洗浄した後に, 血球計算盤を用いて生細胞数を算出した。同時に, 継代維持しておいた SP2 も, 無血清 IMDM で 3 回遠心洗浄した後に, 同様に生細胞数を算出した。

c. 細胞融合

細胞融合は、SP2 とリンパ球の割合が 1 対 5 になるように調製して行った。上記の割合で混合した細胞は、遠心して培地を完全に除去した後、あらかじめ 37°C に温めておいたポリエチレングリコール 1500 (polyethylene glycol; PEG, Roche) 1 ml を 1 分間かけてすべての細胞に丁寧に添加し、その後 1 分間静置した。静置後、あらかじめ 37°C に温めておいた無血清 IMDM 10 ml を 1 滴ずつゆっくりと加えて、細胞を十分攪拌し、PEG を希釈した。細胞は、無血清 IMDM 50 ml で 2 回遠心洗浄した後、あらかじめ 37°C に温めておいた 5.0×10^{-3} M hypoxanthine, 2.0×10^{-5} M aminopterin, 8.0×10^{-4} M thymidine (HAT, SIGMA), 10% hybridoma cloning factor (HCF, ORIGEN) および 10% FBS 添加 IMDM 中に再浮遊させ、96 ウェル細胞培養用プレート (BECTON DICKINSON) に 1 ウェル当たり 100 μ l 播いて、37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養を開始した。

d. 陽性ウェルの選抜およびクローニング

培養 7 日目以降に出現したハイブリドーマウェル中の陽性ウェルは、その培養上清を用いて、原核型 rchIL-6 を抗原とした固相酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) により選抜した。

NUNC-IMMUNO MODULE (Nunc) に (2)-g で精製した原核型 rchIL-6 を 1 ウェル当たり 50 μ l (5 μ g) 添加し、37°C で 1 時間固相化した。固相化後、抗原液を除き、25% (w/v) BlockAce (雪印乳業) 含 PBS を添加して、37°C で 1 時間ブロッキングした。続いて、ブロッキング液を除き、各ウェルの培養上清を 50 μ l 添加し、37°C で 1 時間 1 次反応を行った。1 次反応後、上清を除き、0.05% Tween-20 含 PBS で各ウェルを 4 回洗浄した後に、10% BlockAce 含 PBS で 1000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase; AP) 標識ヤギ抗マウス Ig 抗体 (Kirkegaard and Perry Laboratories) を添加し、37°C で 1 時間 2 次反応を行った。2 次反応後、抗体液を除き、1 次反応後と同様の方法で各ウェルを 7 回洗浄した。洗浄後、*p*-nitrophenyl phosphate (pNPP, Kirkegaard and Perry Laboratories) を pNPP 溶解液 [100 mM glycine, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂ (pH 10.4)] に溶解し、1 ウェル当たり 50 μ l 添加して暗所室温で 15 分間反応させた後、マイクロプレートリーダー Model 680 (BIO RAD) を用いて検出波長 405 nm および対照波長 600 nm の吸光度を測定した。

続いて、陽性ハイブリドーマのクローニングは、限界希釈法により行った。上記の ELISA において陽性反応を示したハイブリドーマは、HAT, 10% HCF および 10% FBS 添加 IMDM 中で培養維持した後、細胞数を算出し 0.35% Agar Noble (BECTON

DICKINSON) および 10% FBS 添加 IMDM 中に 200 cells/ml になるように調製し, 60 mm 培養ディッシュ (BECTON DICKINSON) に 5 ml 播いて, 室温で 20 分間静置して培地を固化させた後に, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養を開始した. 培養開始 1 週間前後から形成されるハイブリドーマコロニーは, 顕微鏡下でパスツールピペットを用いて無菌的に回収し, あらかじめ 10% HCF および 10% FBS 添加 IMDM 100 µl を添加しておいた 96 ウェル細胞培養用プレートに懸濁し, 上記と同条件で培養を開始した. 各ハイブリドーマクロンの抗原特異性の検討は, その培養上清を用いて, 上記と同様に ELISA により行った.

e. モノクローナル抗体のサブクラスの決定

樹立したハイブリドーマクロンのサブクラスは, マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット (Amasham Biosciences) を用いて, キット添付のプロトコルに従って決定した.

f. ウェスタンブロット解析

50 ng の原核型 rchIL-6 は, 6 倍濃度のサンプル緩衝液 [375 mM Tris-HCl (pH 7.0), 12% SDS, 10% sucrose, 0.04% bromophenol blue (BPB)] と 5 対 1 の割合で混合して 5 分間煮沸した後に, 常温で冷した. その後, 12.5% ポリアクリルアミドゲルに添加し, compact PAGE (ATTO) を用いて泳動用緩衝液 [25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.1% SDS, 192 mM glycine] 中で電気泳動した. なお, 陰性対照として, 等量のリコンビナントマウス IL-6 (rmoIL-6, Upstate biotechnology) も同様に調製し, 電気泳動した. 泳動終了後, ゲルをゲル版から取り外し, 濾紙および Immun-Blot PVDF membrane (BIO RAD) と共に転写緩衝液 (100 mM Tris, 192 mM glycine, 0.01% SDS, 5% methanol) に浸した. 続いて, ゲルと PVDF 膜が濾紙に挟まれるように重ね合わせ, POWER PAC 3000 (BIO RAD) を用いて, 350 mA の定電流で 1.5 時間通電して転写した. 転写終了後, 転写膜をブロッキング液 [5% skim milk, 0.2% Tween-20, 2.5 mM EDTA (pH 8.0), 94.8% PBS] に浸し, 室温で 1 時間ブロッキングした. ブロッキング終了後, 転写膜を取り出し, 各ハイブリドーマクロンの培養上清に浸して, 暗所室温で 1 時間 1 次反応を行った. 1 次反応後, 培養上清を除き, 転写膜を洗浄液 [1% skim milk, 0.2% Tween-20, 2.5 mM EDTA (pH 8.0), 98.8% PBS] 中で 5 分間, 3 回の振盪洗浄を行った. 洗浄後, 転写膜を洗浄液から取り出し, 洗浄液で 3000 倍に希釈した西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (horse-radish peroxidase; HRPO) 標識ヤギ抗マウス Ig 抗体 (Kirkegaard and Perry Laboratories) に浸し, 暗所室温で 1 時間 2 次反応を行った. 反応終了後, 抗

体液を除き，転写膜を洗浄液中で 10 分間，3 回の振盪洗浄を行った．最後に，検出および現像は，ECL plus Western Blotting Detection system (Amasham Biosciences) および LAS-3000 (富士フィルム) をそれぞれ用いて，キットおよび機器添付のプロトコルに従って行った．

(4) 真核細胞発現 rchIL-6 の作製

真核細胞発現 rchIL-6 (以降，真核型 rchIL-6 と記す) の作製は，真核細胞用発現ベクターである pSeqTag2 A (Invitrogen) を発現ベクターとして用いた．pSeqTag2 A は，MCS の 5' 上流に分泌シグナル用としてマウスの Igk リーダー配列が，また 3' 下流にタンパク質検出用として *myc* およびタンパク質精製用として 6 つのヒスチジン残基 (6 x His) をコードする遺伝子が付加されている．リコンビナントタンパク質は，リーダー配列を利用して膜上または細胞外に分泌され，6 x His とニッケルレジンの親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製が可能である．

a. chIL-6 遺伝子の増幅

chIL-6 遺伝子の増幅は，本章の材料と方法 (2)-c と同様に，Advantage GC2 polymerase を用いた PCR 法により行った．成熟型 chIL-6 をコードする領域を増幅するために，chIL-6 の塩基配列を元にプライマーを作製し (pSeq-chIL6-F, pSeq-chIL6-R)，作製した各プライマーの 5' 末端には，タンパク質発現ベクターの MCS へのライゲーションを考慮して，それぞれ *Hind* III および *Xho* I の制限酵素部位を付加した．PCR 反応は，本章の材料と方法 (2)-d で作製した chIL-6 プラスミド DNA を鋳型として，94°C，3 分間の加熱の後に，94°C，30 秒間 (熱変性)，58°C，30 秒間 (プライマーのアニーリング) および 68°C，3 分間 (伸長反応) を 1 サイクルとして 30 サイクル行い，最後に 68°C，3 分間反応させた．サーマルサイクラーは，PTC-100 Programmable Thermal Controller を使用した．なお，プライマーの塩基配列は表 3 に，PCR の反応組成は表 7 に示した．

b. 真核型 rchIL-6 発現ベクターの作製

a で増幅した遺伝子断片は，発現ベクターである pSeqTag2 A と共に *Hind* III および *Xho* I を用いて制限酵素処理を行った後に，本章の材料と方法 (2)-d に準じて，アガロースゲル電気泳動から切り出し精製までの操作を行った．精製した遺伝子断片は，Ligation High ligation kit を用いて，キット添付のプロトコルに従って chIL-6

表7. 真核型rchIL-6 のPCR 反応液組成

組成	容量 (μl)
5 x Advantage GC-2 buffer	5.0
2 mM dNTPs	2.5
GC Melt	7.5
pSeq-chIL6-F (10 μM)	1.0
pSeq-chIL6-R (10 μM)	1.0
chIL-6-T easy plasmid DNA (10 ng/μl)	4.0
Advantage GC-2 polymerase	0.5
DW	3.5
計	25.0

伝子と pSecTag2 A をライゲーションした。ライゲーション後の反応液は、宿主大腸菌 DH5a コンピテント細胞 (TOYOBO) に対して 1/10 量を加えた後に、氷中で 20 分間静置した。続いて混合液は、42°C で 1 分間加温して再び氷中で 1 分間急冷後、混合液に LB 培地を 500 ml 添加して 37°C で 1 時間振盪培養し、この培養液 100 μ l を 100 μ g/ml アンピシリン含 LB プレートに塗布し、37°C で 12 時間培養した。出現したコロニーが目的の遺伝子を保有しているか否かを確認するために、pSeq-F および pSeq-R プライマーを用いたコロニー PCR を行った。コロニー PCR は、本章の材料と方法 (2)-d に準じて行った。なお、プライマーの塩基配列は表 3 に示した。反応終了後の PCR 反応液は、1% アガロースゲル中で電気泳動後、本章の材料と方法 (2)-d に準じてバンドを検出した。目的のバンドが検出できた PCR 反応液は、4 U の exonuclease I (Exo I, Amasham Biosciences) および 0.8 U の shrimp alkaline phosphatase (SAP, Amasham Biosciences) を加えてよく混和し、37°C で 1 時間保温することで、反応液中のプライマーを完全に除去した。酵素反応は、80°C で 20 分間加熱することで停止させた。酵素処理後の遺伝子断片は、Big Dye terminator ver. 3.1 cycle sequencing kit および pSeq-F, pSeq-R プライマーを用いたダイレクトシーケンシング法 [55] によりシーケンシング反応を行った。以降の塩基配列の決定および解析は、本章の材料と方法 (2)-d に準じて行った。

c. 真核型 rchIL-6 plasmid DNA の大量調製

目的遺伝子の保有が認められた大腸菌クローンは、100 μ g/ml アンピシリン含 LB 培地 2 ml 中で、37°C で終夜振盪培養した。翌日、100 μ l の培養液を、新たな 100 μ g/ml アンピシリン含 LB 培地 10 ml に植え継ぎ、37°C で 3 時間振盪培養した。3 時間後、培養液 10 ml を新たな 100 μ g/ml アンピシリン含 LB 培地 150 ml に植え継ぎ、37°C で 6 時間振盪培養した。培養後の大腸菌からのプラスミド DNA の抽出は、Endo-free Maxi kit (Qiagen) を用いて、キット添付のプロトコルに従って行った。抽出後のプラスミド DNA は、Ultrospec 2100 pro を用いて濃度を測定し、使用時まで -20°C で保存した。

d. 真核型 rchIL-6 プラスミド DNA の細胞への導入およびタンパク質発現

c で調製した真核型 rchIL-6 プラスミド DNA は、哺乳動物細胞用遺伝子導入試薬、Transfectin Lipid Reagent (BIO RAD) を用い、キット添付のプロトコルに従って、COS-7 または CHO-K1 に導入した。リコンビナントタンパク質は、発現ベクターが保持するヒトサイトメガロウイルス (cytomegalovirus; CMV) プロモーターを利用して細胞

内で発現させ、発現タンパク質は導入 48 時間後に培養上清を回収し、本研究で樹立した抗 chIL-6 モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析により検出した。なお、ウエスタンブロット解析の基本操作は、本章の材料と方法 (3)-f に準じた。

e. 真核型 rchIL-6 の精製および定量

真核型 rchIL-6 は、リコンビナントタンパク質の C 末端に付加する 6 x His とニッケルレジンの親和性を利用したアフィニティー精製により精製した。回収した培養上清は、ProBond Resin (Invitrogen) と室温で 1 時間転倒混和し、ニッケルレジンカラムと目的のタンパク質を結合させた。結合後のカラムは、非結合タンパク質を未吸着分画として回収後、カラム容量の 8 倍量の Native washing buffer [50 mM sodium acetate, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazol (pH 8.0)] で 4 回洗浄し、洗浄分画を回収した。洗浄後、カラムは 12 倍容量の Native elution buffer [50 mM sodium acetate, 0.5 M NaCl, 0.25 M Imidazol (pH 8.0)] で結合しているタンパク質を溶出させ、溶出分画として回収した。

回収した各分画は SDS-PAGE に供試して、溶出分画中に目的のタンパク質があることを確認した。溶出分画中の真核型 rchIL-6 は、本章の材料と方法 (2)-g で精製した原核型 rchIL-6 を標準試料として、抗 chIL-6 モノクローナル抗体を用いた定量的 ELISA により定量した。抗原は、溶出分画および 0.5-50 $\mu\text{g/ml}$ 原核型 rchIL-6 を 1 ウェル当たり 50 μl 添加して固相化し、1 次抗体として 1000 倍希釈抗 chIL-6 モノクローナル抗体 (E3) を、2 次抗体として 1000 倍希釈 AP 標識抗マウス Ig 抗体を用いた。真核型 chIL-6 の定量は、各濃度の原核型 rchIL-6 の検出波長である 405 nm の数値から検量線を作製し、溶出分画中の目的タンパク質の濃度を算出した。なお、ELISA の基本操作は、本章の材料と方法 (3)-d に準じた。

(5) HUC2-13 および MH60 に対する rchIL-6 の効果の検討

a. 細胞増殖促進効果の検討

培養維持しておいた HUC2-13 および MH60 は 50 ml チューブに回収し、無血清 IMDM を用いて 3 回遠心洗浄して血清成分を完全に除去した。その後、血球計算盤により生細胞数を算出し、終濃度が 5×10^4 cells/ml の濃度になるように 10% FBS 添加 IMDM に添加した。本培地には、原核型または真核型 rchIL-6 の終濃度が 0-100 ng/ml の濃度になるようにそれぞれ添加して (MH60 は最大 10 ng/ml まで)、96 ウェル細胞培養用プレートに 1 ウェル当たり 100 μl ずつ播いて、それぞれ両ハイブリド

ーマの至適条件下のインキュベーター内で 3 日間培養した。

細胞増殖活性は、培養 1 日毎に WST-1 [56] を用いて測定した。WST-1 [2-(4-Iodophenyl),3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] (Roche) は、1 ウェル当たり 10 μ l を添加混和し、それぞれ両ハイブリドーマの至適条件下のインキュベーター内で 2 時間反応させた。反応後の培養液は、ELISA 用プレート (住友ベークライト) に全量分注し、マイクロプレートリーダー Model 680 を用いて検出波長 450 nm および対照波長 600 nm の吸光度を測定した。成績は、同条件の 3 つの測定値の平均値であらわした。

b. チロシンリン酸化 STAT3 およびセリンリン酸化 MEK1/2 の検出

HUC2-13 および MH60 は、各ハイブリドーマの増殖培地中で継代維持した後に、血球計算盤により生細胞数を算出し、終濃度が 1×10^6 cells/ml の濃度になるように 2% FBS 添加 IMDM に再浮遊させ、12 ウェル細胞培養用プレート (BECTON DICKINSON) に 1 ml ずつ分注して終夜培養した。翌日、両ハイブリドーマに対して rhIL-6 の終濃度が 0-100 ng/ml の濃度で添加して (MH60 は 10 ng/ml まで)、それぞれ両ハイブリドーマの至適条件下のインキュベーター内で、15 分間刺激培養した。培養後、細胞はすべて 1.5 ml チューブに回収し、PBS を用いて 2 回遠心洗浄し、培地および血清成分を完全に除去した。培地を除去した後の細胞は、細胞可溶化緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM sodium pyrophosphate, protease inhibitor tablet (Roche)] 300 μ l を用いて 4°C で終夜可溶化し、12,000 x g で 10 分間遠心して上清を回収した。上清中のタンパク濃度は、BCA Protein Assay Kit を用いて、キット添付のプロトコルに従って測定した。濃度測定後、上清は、使用時まで -80°C で保存した。

同タンパク量の上清は、7.5 または 10% ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した後に、転写膜にブロッティングし、リン酸化タンパク質用ブロッキング液 [5% non-fat dried milk, 0.2% Tween-20, 2.5 mM EDTA (pH 8.0), 94.8% Tris-buffered saline (TBS)] を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、転写膜をリン酸化タンパク質用洗浄液 [0.2% Tween-20, 2.5 mM EDTA (pH 8.0), 99.8% TBS] で 1000 倍希釈したウサギ抗 STAT3 (CALBIOCHEM), ウサギ抗チロシンリン酸化 STAT3 (Cell Signaling), ウサギ抗 MEK1/2 (Cell Signaling) またはウサギ抗セリンリン酸化 MEK1/2 (Cell Signaling) 抗体にそれぞれ浸し、4°C で緩やかに振盪しながら終夜反応させた。反応後、転写膜はリン酸化タンパク質用洗浄液で洗浄し、同洗浄液で 3000 倍に希釈した HRPO 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 (Kirkegaard and Perry Laboratories) に浸して、室温で緩やかに振盪しながら 1 時間反応させた。反応終了後、転写膜を洗

浄液で洗浄し、検出および現像を ECL plus Western Blotting Detection system および LAS-3000 をそれぞれ用いて、キットおよび機器添付のプロトコルに従って行った。なお、泳動およびブロッティング操作は、本章の材料と方法 (3)-f に準じた。

c. HUC2-13 培養上清中の抗体量の測定

HUC2-13 培養上清中の抗体量の測定は、定量的 ELISA により行った。a と同様に調製した HUC2-13 は、38.5°C、5% CO₂ インキュベーター内で 5 日間培養した。培養上清は 1 日毎に回収し、使用時まで 4°C で保存した。

NUNC-IMMUNO MODULE に、当研究室で樹立した、ニワトリ IgY を認識するマウスモノクローナル抗体 (1γ) [41] を 1 ウェル当たり 2.5 μg 添加して、37°C で 1 時間固相化した。固相化後、ブロッキング液を添加して 37°C で 1 時間ブロッキングした。続いて、ブロッキング液を除き、回収しておいた各培養上清を 1 ウェル当たり 50 μl 添加し、37°C で 1 時間 1 次反応を行った。なお、標準試料として、精製卵黄 IgY を 0.05-2.5 μg 添加して、同様に 1 次反応を行った。1 次反応後、ウェルを洗浄し、10% BlockAce 含 PBS で 1000 倍希釈した AP 標識ヤギ抗ニワトリ IgG (H+L) 抗体 (Kirkegaard and Perry Laboratories) を添加し、37°C で 1 時間 2 次反応を行った。2 次反応後、抗体液を除き、1 次反応後と同様の方法で各ウェルを 7 回洗浄した。洗浄後、pNPP を pNPP 溶解液に溶解し、1 ウェル当たり 50 μl 添加して暗所室温で 15 分間反応させた後、マイクロプレートリーダー Model 680 を用いて検出波長 405 nm および対照波長 600 nm の吸光度を測定した。なお、洗浄操作は、本章の材料と方法 (3)-d に準じた。

2.3 成績

(1) 原核型 rchIL-6 の作製

本章では、成熟型 chIL-6 をコードする遺伝子領域を大腸菌発現ベクターにクローニングし、大腸菌に感染させて GST 融合 chIL-6 発現大腸菌を得た。

a. chIL-6 遺伝子のクローニング

TA クローニングにより chIL-6 遺伝子のクローニングを行い、塩基配列の決定の後に相同性検索を行った。その結果、報告されている chIL-6 の塩基配列と完全に一致する配列を持つプラスミド DNA を取得した。

b. 原核型 rchIL-6 の精製

rchIL-6 発現大腸菌の培養および原核型 rchIL-6 タンパク質の発現誘導は、筆者の本学部博士課程前期時の修士論文 [63] で決定した至適条件に準じて行った。

原核型 rchIL-6 の精製は、はじめに GST に親和性を持つグルタチオン・セファロース 4B カラムを用いて行った。GST 融合 chIL-6 をグルタチオンレジエンに結合後、PreScission Protease を添加して、GST と chIL-6 の介在配列を特異的に認識・切断させ、目的のタンパク質のみを溶出させ、各分画を SDS-PAGE に供試した。その結果、溶出分画に原核型 rchIL-6 を示す 22 kDa のバンドが検出された (図 3 および図 5, レーン 3) が、この溶出分画は、多くの大腸菌由来タンパク質を含んでいた。

そこで、陰イオン交換クロマトグラフィーによる 2 度目の精製を試みた。はじめに、使用バッファの至適 pH を 6.0 から 9.0 の範囲で検討したところ、pH 8.0 の条件で最も目的タンパク質がカラムに結合することがわかった (データは示していない)。そこで、pH 8.0 の条件でクロマトグラフィーを行い (図 4)、溶出分画を SDS-PAGE に供試したところ、原核型 rchIL-6 を示す 22 kDa のバンドがほぼ単一バンドとして検出された (図 5, レーン 4)。この精製分画は、PBS で終夜透析後、タンパク質の濃度を測定したところ、130 $\mu\text{g/ml}$ の濃度であり、原核型 rchIL-6 は、1 L の大腸菌培養液から約 0.5 mg 得られることがわかった。

(2) 抗 chIL-6 モノクローナル抗体の作製

本研究では、限界希釈法により、5 つの抗 chIL-6 モノクローナル抗体産生ハイブ

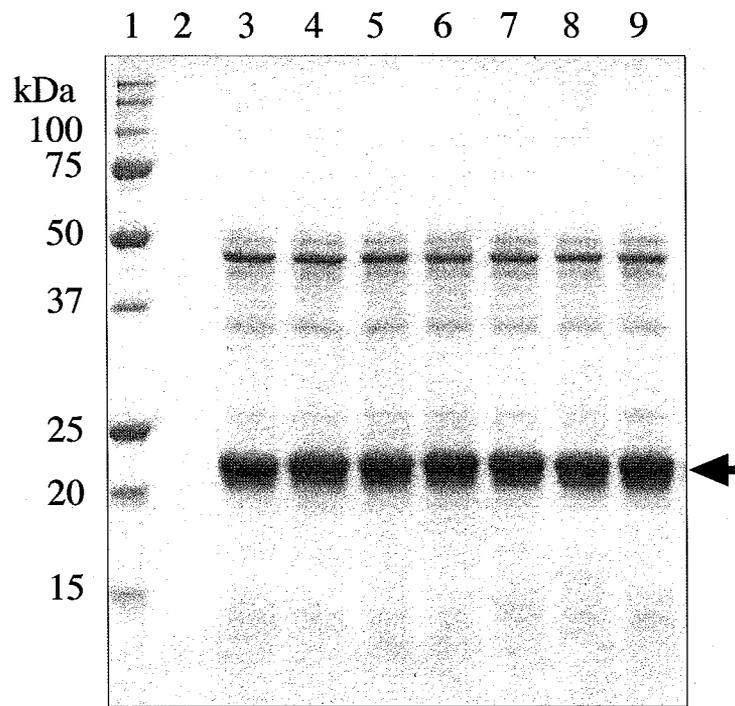


図3. 原核型rchIL-6のアフィニティー精製像

レーン1 ; 分子量マーカー
 レーン3-9 ; 酵素処理後の溶出分画
 ◀ ; rchIL-6 (MW: 21900 Da)

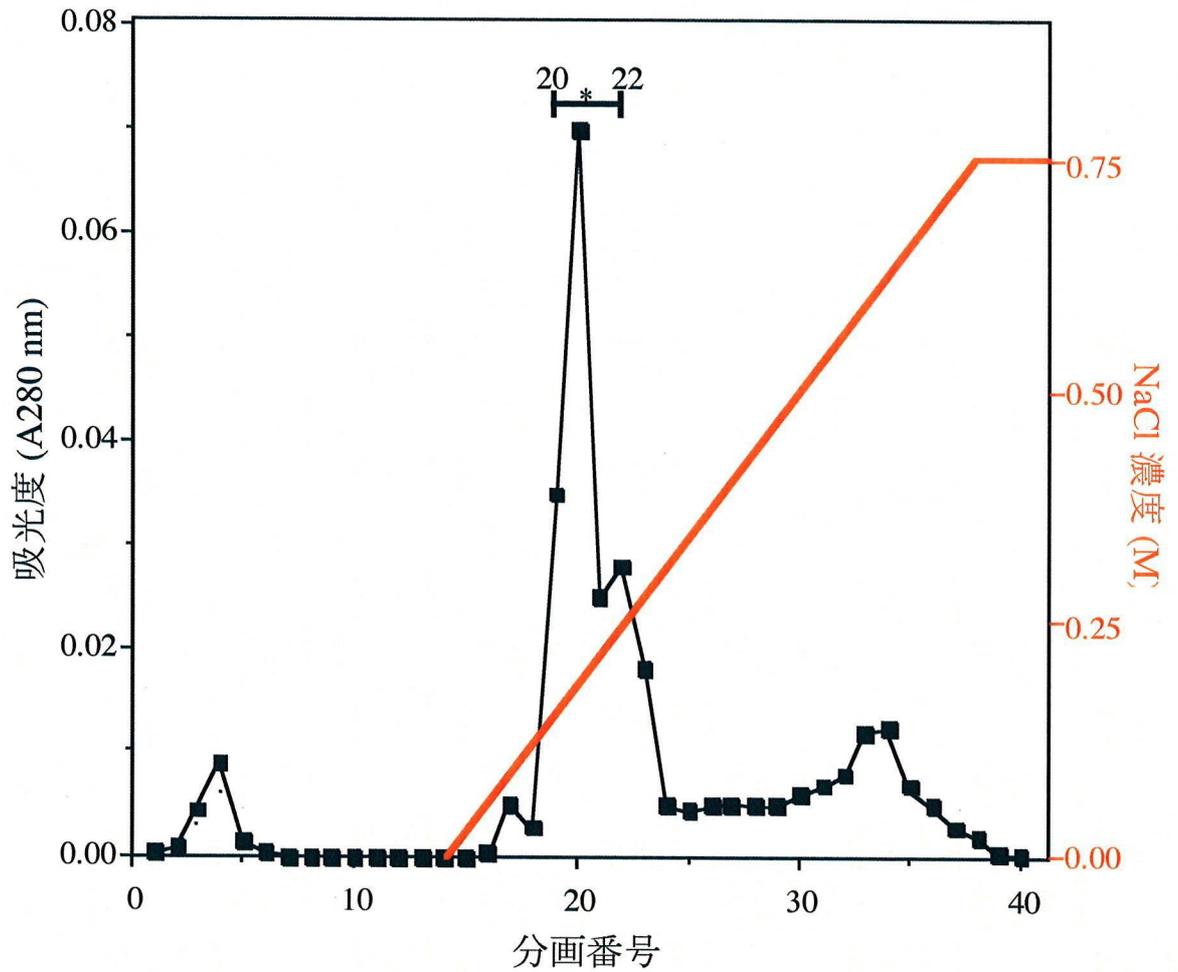


図4. 陰イオン交換クロマトグラフィーにおける原核型rchIL-6
アフィニティー精製分画のタンパク溶出パターン

(*; 原核型rchIL-6 の精製度が最も高かった分画)

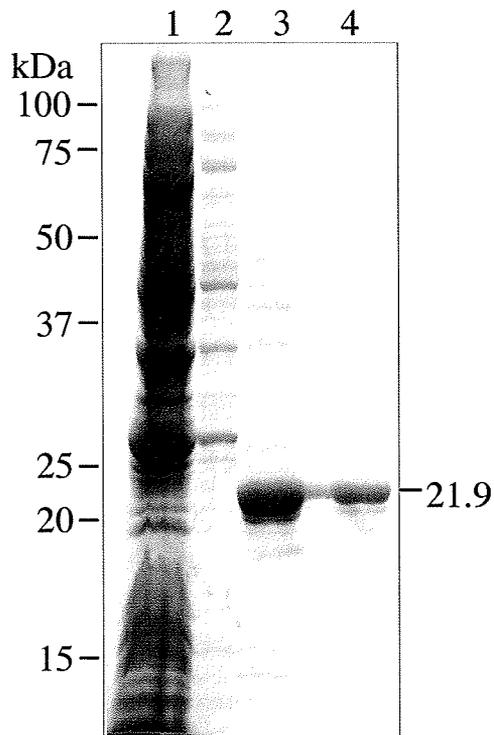


図5. 精製原核型rchIL-6 のCBBR 染色像

レーン1; 未吸着分画	}	アフィニティークロマトグラフィー
レーン2; 洗浄分画		
レーン3; 溶出分画		
レーン4; 溶出分画 (図4の*に相当)		

リドーマ (A6, B1, B2, E3 および E5) を樹立した。

a. 各クローンのサブクラスの決定

各クローンのサブクラスは、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキットを用いて決定し、表 8 に示した。

b. 抗 rchIL-6 モノクローナル抗体の特異性の解析

各モノクローナル抗体の IL-6 に対する反応性は、同タンパク量の原核型 rchIL-6 または rmoIL-6 を用いたウエスタンブロット解析により検討した。その結果、本研究で樹立したすべてのモノクローナル抗体は、原核型 rchIL-6 のみを認識し、rmoIL-6 に対して全く反応性を示さなかった (図 6)。中でも、E3 および A6 クローンは、他の 3 クローンに比べて原核型 rchIL-6 に対する反応性が高いことがわかった。特に E3 に関しては、10 $\mu\text{g/ml}$ LPS で 12 時間刺激培養した HD11 の培養上清中の chIL-6 を検出することが可能であり (図 7)、HUC2-13 に対して原核型 rchIL-6 と共添加することにより、HUC2-13 内のリン酸化 STAT3 タンパク質の量が濃度依存的に減少していたことから (図 8)、E3 はネイティブな chIL-6 を検出できると同時に、阻害活性を持つ抗体であることがわかった。

(3) 真核型 rchIL-6 の作製

真核型 rchIL-6 は、成熟型 chIL-6 をコードする遺伝子を真核細胞発現ベクターにクローニングし、COS-7 および CHO-K1 に導入することにより作製した。

a. 真核型 rchIL-6 の発現

真核型 rchIL-6 の発現は、遺伝子導入 24 および 48 時間後の COS-7 または CHO-K1 の培養上清を用いて、抗 chIL-6 モノクローナル抗体 E3 によるウエスタンブロット解析により検討した。その結果、分子量約 26 kDa の真核型 rchIL-6 は、両細胞共に培養 24 時間後から上清中に認められ、培養 48 時間後の培養上清中にはさらに強いシグナルとして認められた (図 9)。

b. 真核型 rchIL-6 の精製および定量

表8. 本研究で樹立した抗chIL-6モノクローナル抗体のサブクラス

clone name	class	light chain
A6	IgG1	kappa
B1	IgG1	kappa
B2	IgG2a	kappa
E3	IgG2a	kappa
E5	IgG1	kappa

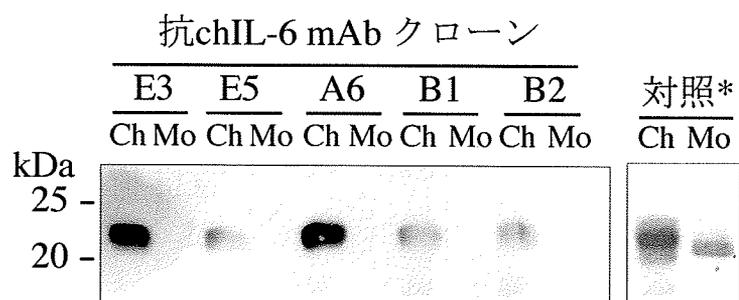


図6. 抗chIL-6 モノクローナル抗体の異種動物IL-6 に対する交差反応性

Ch ; 精製原核型rchIL-6 (50 ng/レーン)
 Mo ; rmoIL-6 (50 ng/レーン)

* 各組み換えIL-6 を1 μ g/レーンで泳動後のCBB 染色像

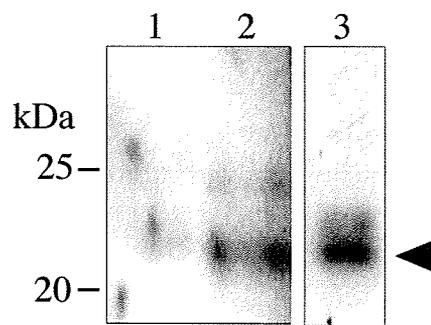


図7. モノクローナル抗体E3 を用いたLPS 刺激HD11 培養上清中の
chIL-6 の検出

レーン1; LPS 無刺激HD11 培養上清

レーン2; 10 µg/ml LPS 刺激HD11 培養上清

レーン3; 原核型rchIL-6 (50 ng/レーン) (陽性対象)

◀; chIL-6

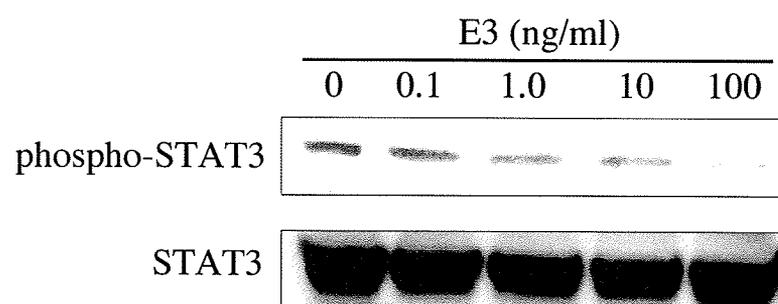


図8. モノクローナル抗体 (E3) を用いたHUC2-13内のSTAT3
リン酸化阻害試験

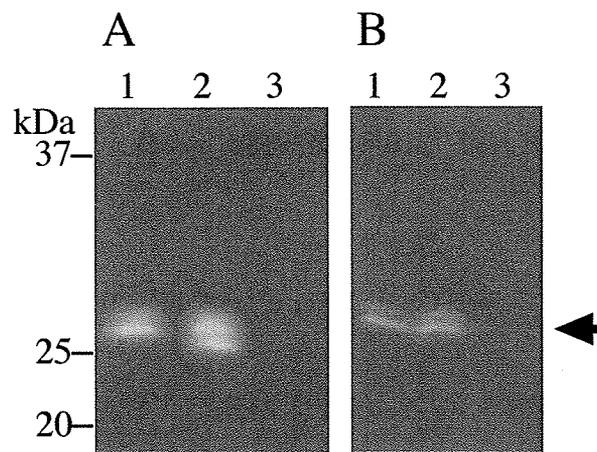


図9. 真核細胞培養上清中の真核型rchIL-6 の検出

A. COS-7
B. CHO-K1

レーン1; chIL-6 発現ベクター導入24 時間後の培養上清
 レーン2; chIL-6 発現ベクター導入48 時間後の培養上清
 レーン3; PSA 発現ベクター (陰性対象) 導入48 時間後の培養上清

◀ ; 真核型rchIL-6

真核型 rchIL-6 は、リコンビナントタンパク質の C 末端に付加した 6 x His とニックレルレジンの親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。溶出分画を 1 ml ずつ 10 本分取して (計 10 ml), その内、10 μ l を SDS-PAGE に供試した結果、真核型 rchIL-6 を示す分子量約 26 kDa のバンドが検出された (図 10, レーン 4-9)。また、同サンプルを用いて抗 chIL-6 モノクローナル抗体 E3 によるウエスタンブロット解析を行ったところ、分子量 26 kDa のバンドが検出された (図 10, レーン 10)。続いて、原核型 rchIL-6 を標準試料とした定量的 ELISA により溶出分画中の真核型 rchIL-6 を定量したところ、COS-7 培養上清由来溶出分画は 2.8 μ g/ml, CHO-K1 培養上清由来溶出分画は 1.8 μ g/ml の濃度であることがわかり、真核型 rchIL-6 は 100 ml の COS-7 培養上清から約 56 μ g, CHO-K1 培養上清から約 36 μ g 得られることがわかった。(なお、真核型 rchIL-6 は、第 4 章を考慮して CHO-K1 由来のタンパク質のみを使用した。)

(4) HUC2-13 および MH60 に対する rchIL-6 の効果の検討

本研究で作製した原核および真核型 rchIL-6 は、10% FBS 培養条件下の HUC2-13 および MH60 に対して、それぞれ 0.1-100 ng/ml および 0.1-10 ng/ml の濃度になるように添加し、以下の活性試験により有効性を検討した。

a. 細胞増殖促進効果の検討

rchIL-6 の細胞増殖促進効果は、WST-1 法により測定した。その結果、rchIL-6 は、培養 2 日目以降で原核型および真核型のいずれも濃度依存的に MH60 の細胞増殖を促進した (図 11A, B)。その際、原核型および真核型 rchIL-6 の細胞増殖促進効果は、同濃度条件下においてほぼ同程度であった。一方、HUC2-13 では、いずれの rchIL-6 濃度条件下においても、rchIL-6 添加による細胞増殖の促進は認められなかった (図 12A, B)。

b. HUC2-13 および MH60 におけるリン酸化シグナル伝達分子の検出

原核型 rchIL-6 添加による HUC2-13 および MH60 内 STAT3 および MEK1/2 のリン酸化を、各特異抗体を用いたウエスタンブロット解析により検討した。

はじめに、MH60 におけるチロシンリン酸化 STAT3 およびセリンリン酸化 MEK1/2 の検出を試みた。その結果、図 13 に示すように、MH60 内の STAT3 タンパク質量は、いずれの rchIL-6 濃度条件においても変化していなかったが、リン酸化 STAT3

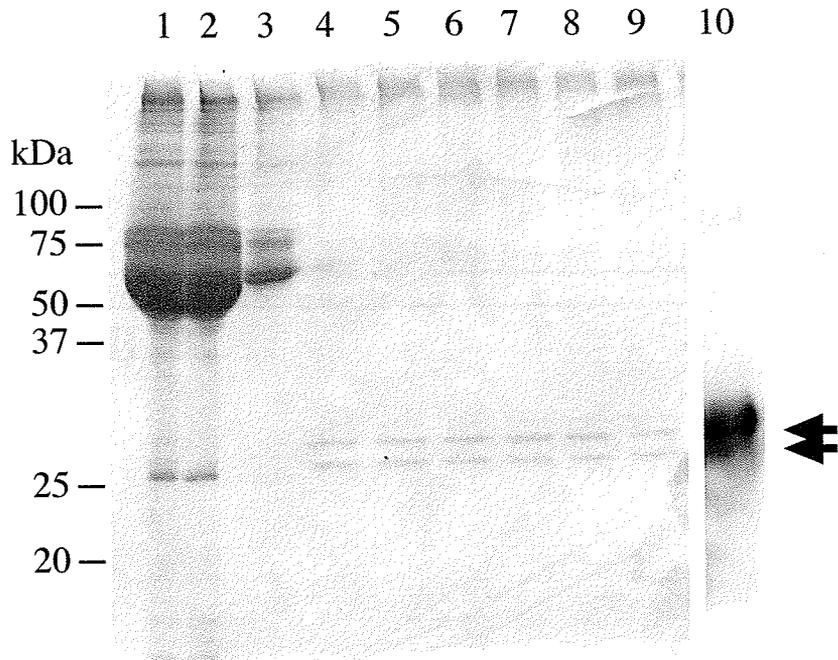


図10. 真核型rchIL-6 (COS-7 培養上清由来) のアフィニティー精製像

- レーン1 ; 非結合分画
- レーン2 ; 洗浄分画1
- レーン3 ; 洗浄分画2
- レーン4-9 ; 溶出分画
- レーン10 ; E3 を用いたウェスタンブロット解析像

◀; 真核型rchIL-6

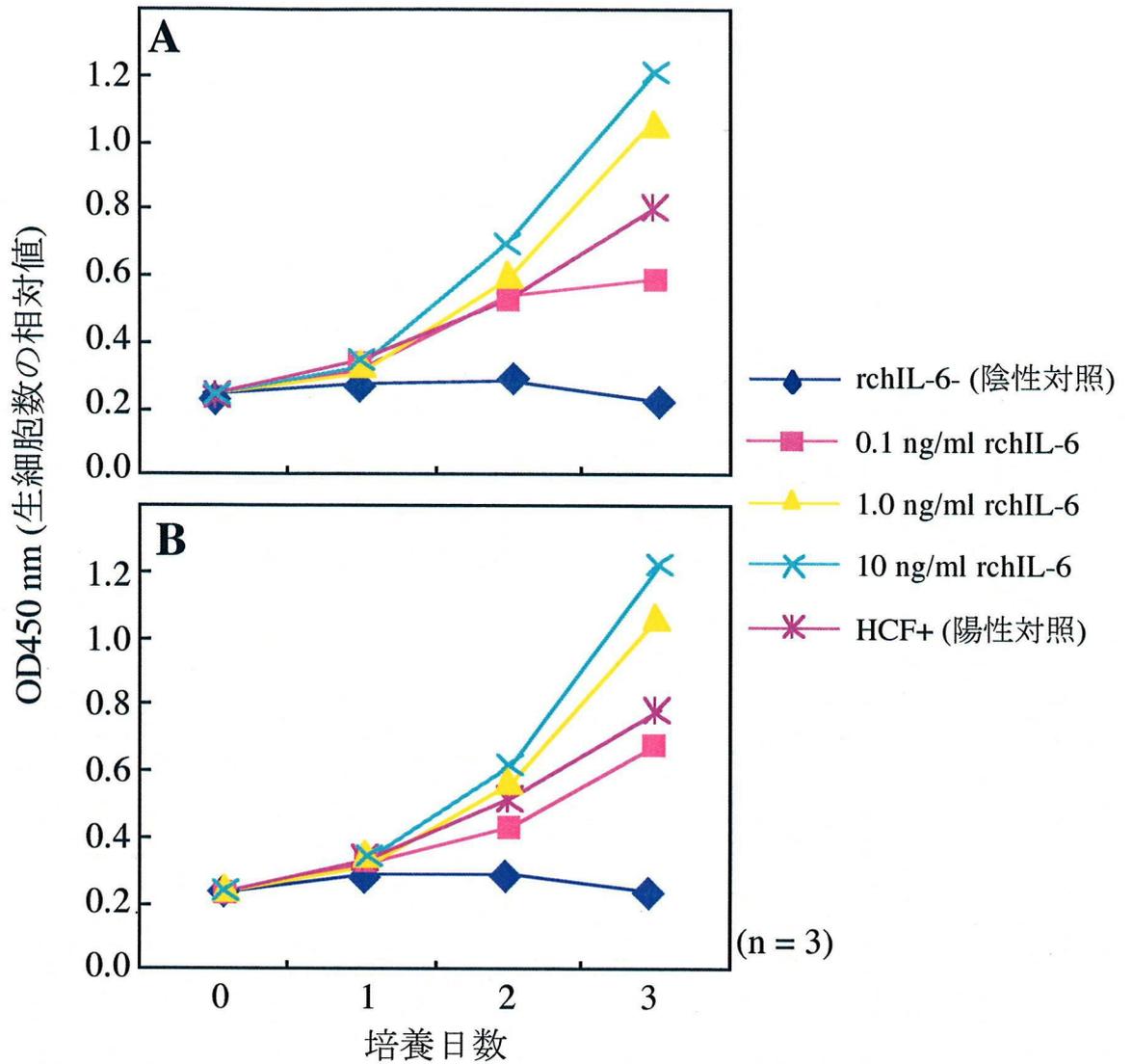


図11. rchIL-6 のMH60 (IL-6 依存性マウスハイブリドーマ) に対する細胞増殖活性

A; 原核型rchIL-6
 B; 真核型rchIL-6

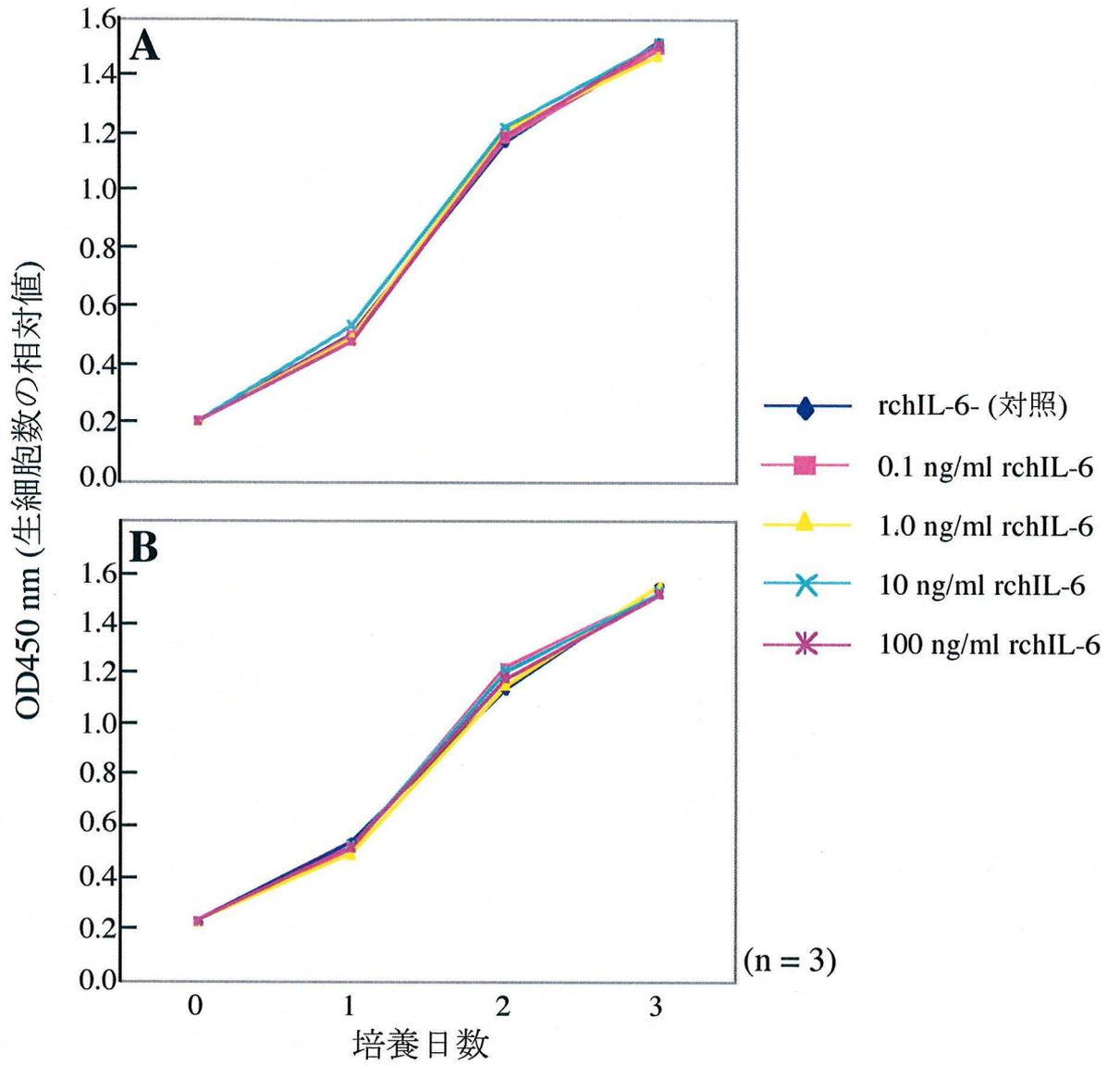


図12. rchIL-6 のHUC2-13 に対する細胞増殖活性

A; 原核型rchIL-6

B; 真核型rchIL-6

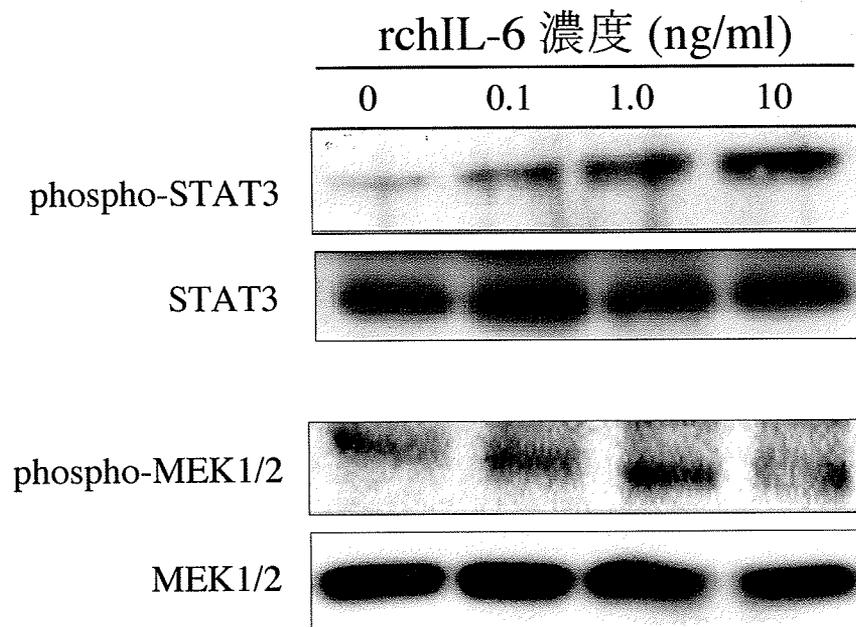


図13. rchIL-6 添加時におけるMH60 内チロシンリン酸化STAT3 およびセリンリン酸化MEK1/2 の検出

タンパク質量は、原核型 rchIL-6 濃度依存的に増加していた。一方、MEK1/2 タンパク質およびセリンリン酸化全 MEK1/2 タンパク質量は、いずれの rchIL-6 濃度条件においても変化していなかった (真核型 rchIL-6 を添加した場合も、同様の結果であった。データは示していない)。

続いて、HUC2-13 におけるリン酸化 STAT3 およびリン酸化 MEK1/2 の検出を試みた。その結果、図 14 に示すように、HUC2-13 内の STAT3 タンパク質量は、MH60 と同様いずれの原核型 rchIL-6 濃度条件においても変化していなかったが、チロシンリン酸化 STAT3 タンパク質量は、原核型 rchIL-6 濃度依存的に増加していた。しかし、rchIL-6 同濃度条件下の MH60 と比較して、リン酸化 STAT3 のシグナルは弱かった。一方、MEK1/2 タンパク質およびセリンリン酸化全 MEK1/2 タンパク質量は、いずれの rchIL-6 濃度条件においても変化していなかった (真核型 rchIL-6 を添加した場合も、同様の結果であった。データは示していない)。

c. HUC2-13 産生抗体量の測定

各原核型 rchIL-6 濃度条件下の HUC2-13 培養上清中の抗体量を 1 日毎に計 5 日間測定した結果、図 15 に示すように、rchIL-6 は、1 および 10 ng/ml 添加条件下において培養 4 日目から非添加条件下に比べて抗体量が徐々に増加しており、培養 5 日目の培養上清中の抗体濃度は、非添加条件下において約 0.15 (± 0.003) $\mu\text{g/ml}$ であったのに対し、10 ng/ml 添加条件下において約 0.25 (± 0.04) $\mu\text{g/ml}$ と有意に上昇していた (真核型 rchIL-6 を添加した場合も、同様の結果であった。データは示していない)。

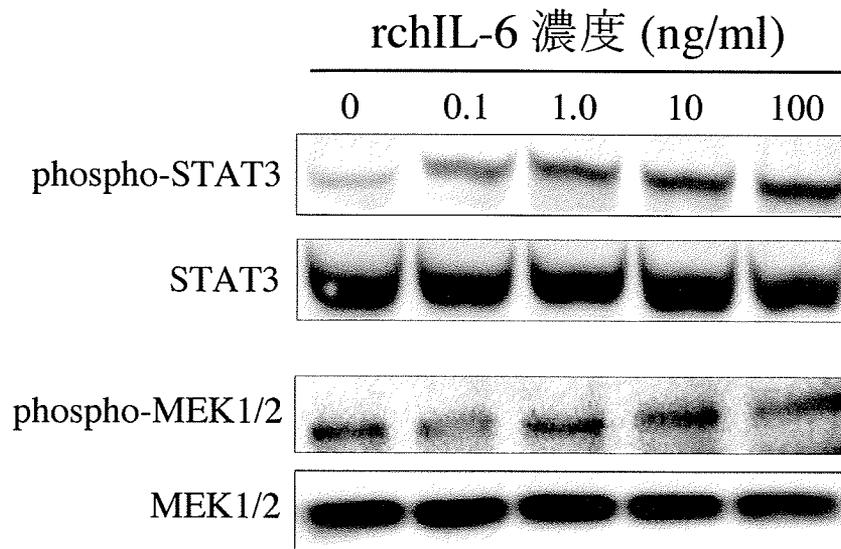


図14. rchIL-6 添加時におけるHUC2-13 内チロシンリン酸化STAT3
およびセリンリン酸化MEK1/2 の検出

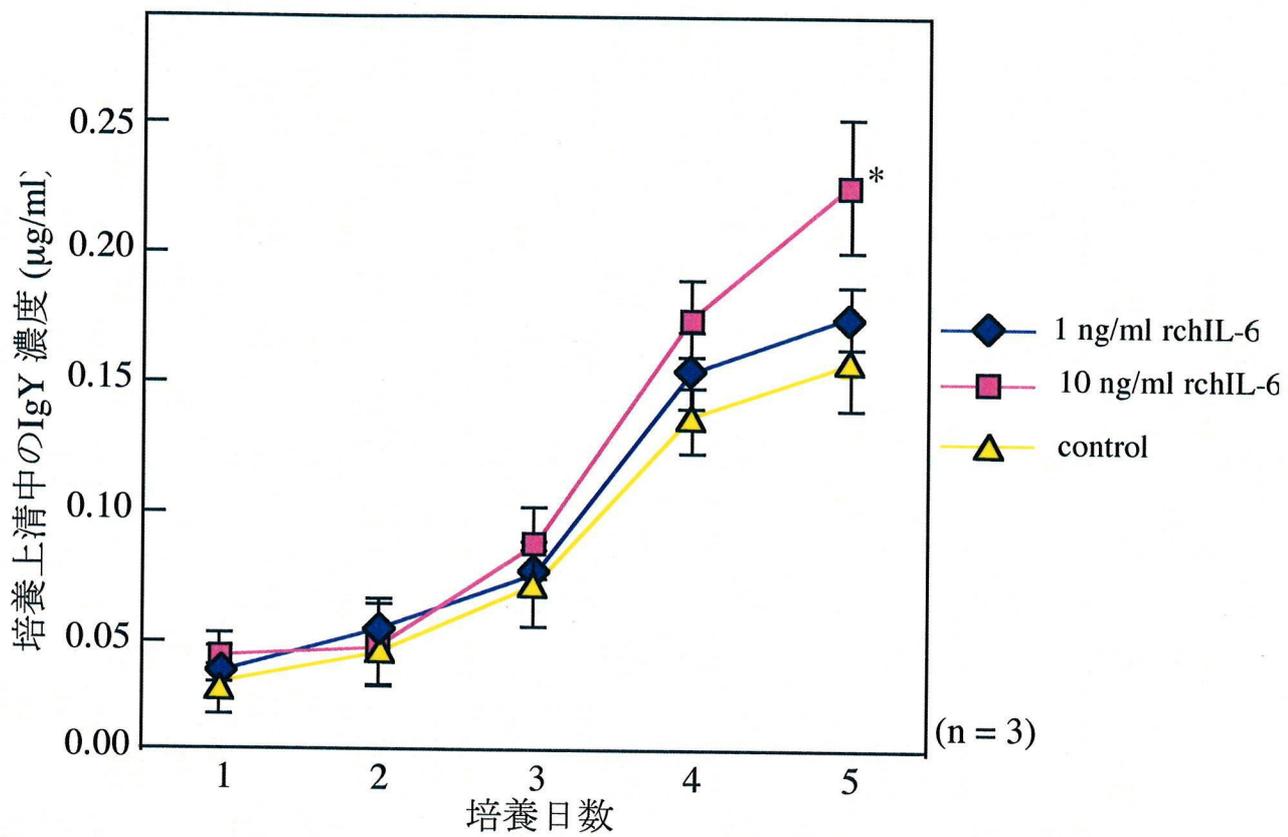


図15. rchIL-6 のHUC2-13 に対する抗体産生促進活性
*; p<0.05

2.4. 考察

ニワトリハイブリドーマ作製技術 [57] は, PrP [44] に代表されるような, 哺乳類間で高度に保存されたタンパク質に対して, 特異性の高い優れたニワトリ型モノクローナル抗体の作製を可能にした. しかし, 現在までに樹立されたニワトリハイブリドーマの抗体産生能は, その多くがマウスハイブリドーマの抗体産生能と比較して低いといった問題点を抱えている. ニワトリハイブリドーマが抱えるこの問題点を解決することは, ニワトリ型モノクローナル抗体の大量調製を可能にし, ニワトリ型モノクローナル抗体の汎用性拡大に繋がるものと考えられる. マウスにおいては, IL-6 が幾つかのマウスハイブリドーマの細胞増殖や抗体産生の促進に作用することが知られており, マウスハイブリドーマの培養系に有用な因子として利用されている. また, 細胞融合時に IL-6 を添加することで, ハイブリドーマの出現率や陽性クローンの出現率が上昇することも報告されており [58], IL-6 の多機能性をうかがうことができる. これまでニワトリでは, 種々の生物活性試験において, chIL-6 の存在は示唆されていたものの [59], 哺乳類 IL-6 相同分子の遺伝子クローニングは報告されていなかった. 当研究室でも, ニワトリハイブリドーマへの活用を目的として, chIL-6 のクローニングを試みてきたが [60, 61, 62, 63], chIL-6 の遺伝子クローニングには至らなかった. しかし 2001 年, ドイツのグループによって chIL-6 の遺伝子クローニングが報告され [8], その組み換えタンパク質を用いた機能解析により, chIL-6 が哺乳類 IL-6 と同様の生物活性を有することが報告された. そこで本研究では, ニワトリハイブリドーマの抗体産生能を改善する方法の一つとしてニワトリ IL-6 の活用に着目し, 本章において rchIL-6 を作製し, ニワトリハイブリドーマに対する生物活性を試験してその有効性を検討した.

はじめに, rchIL-6 の作製のために, LPS 刺激した HD11 由来 cDNA を用いて chIL-6 の遺伝子クローニングを行った. マウスにおいて, マクロファージは代表的な IL-6 産生細胞であること, ドイツのグループが HD11 から chIL-6 遺伝子をスクリーニングしていること [8], また, 筆者の本学の修士論文研究において, LPS 刺激した HD11 で chIL-6 mRNA の発現が強くなっていたことから [63], HD11 が chIL-6 のクローニングに最適な細胞株であると考えられた.

ところで本研究では, 大腸菌発現型 (原核型 rchIL-6) だけでなく, 動物細胞発現型 (真核型 rchIL-6) の 2 種類の rchIL-6 を作製した. その背景として, 原核型 rchIL-6 は, タンパク質の精製が不十分な場合, LPS 等の宿主大腸菌由来タンパク質が混入してしまい, ハイブリドーマに対する活性試験に影響を与えてしまう可能性が考えられたこと, また, 原核細胞と真核細胞ではタンパク質の立体構造形成に関与する分子内シャペロンが異なると考えられていることから, 大腸菌ではタンパク質の正

確な立体構造が形成されない可能性が考えられたためである。当研究室でクローニングされたニワトリ LIF (chLIF) [64] では、原核型よりも真核型のリコンビナントタンパク質の方が、ニワトリ胚盤葉細胞 (chicken blastodermal cells; CBCs) に対する未分化維持能が高い結果が得られていることから (当研究室の未発表データ), chIL-6 でもよりネイティブに近い真核型が有効である可能性が考えられた。しかし、本研究では、原核型 rchIL-6 はアフィニティーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた 2 ステップの精製法を用いたことにより単一バンドまで精製ができたことから (図 5, レーン 4), 大腸菌由来タンパク質の混入はないと考えられる。また、本研究では、原核型および真核型 rchIL-6 の MH60 に対する細胞増殖活性にはほとんど差異が認められなかったことから (図 11), chLIF で認められた真核型の優位性はないものとする。真核細胞と原核細胞におけるタンパク質 (外来タンパク質) の産生時の相違点は、先にも述べたタンパク質の正確なフォールディングと、翻訳後修飾、つまり糖鎖付加が起こるか否かにある。真核型 chLIF が原核型 chLIF よりも高い活性を持っている要因は詳しくは解明されていないが、chLIF には潜在的なアスパラギン型糖鎖付加部位 (NXS/T 配列; X は任意のアミノ酸) が 5 ヶ所存在しており [64], COS-7 やニワトリ胚線維芽細胞株 CHCC-OU2 [65] などの真核細胞で発現させた組み換え chLIF では、糖鎖修飾によって分子量の増加が認められる (未発表データ)。しかし、chIL-6 は潜在的な NXS/T 配列が 1 ヶ所も認められない。そのため、この両ニワトリサイトカインの原核型および真核型における活性の強さの違いは、糖鎖付加の有無にある可能性もあり、大変興味深い。いずれにしても、作製した原核型 rchIL-6 は、真核型 rchIL-6 と同様に機能性を保持したタンパク質であると考えられ、本章では主に原核型 rchIL-6 を活性試験に供試した。また、本研究では、5 つの抗 chIL-6 モノクローナル抗体を樹立した。5 種類のモノクローナル抗体は、その全てが rchIL-6 のみを認識し、rmolIL-6 を認識しなかった。先にも述べたように、chIL-6 と molIL-6 のアミノ酸レベルでの相同性は 30% 未満であることから、これらの抗体は、chIL-6 に特異的な配列を認識した抗体であると思われる。5 つのクローンのうち、A6 と E3 は他の 3 クローンと比較して rchIL-6 に対する反応性が高く、力価の強い抗体であることが示唆された。しかし、阻害活性を持つ抗体クローンは E3 のみであった。これは、本研究で用いた抗原が成熟型 chIL-6 であったことから、レセプターとの結合領域もしくはその周辺領域を認識する抗体が作製できなかったものと考えられる。しかし、E3 に関しては、阻害活性を有していたことから、検出だけではなく、chIL-6 の機能解析にも有効利用できる抗体であると思われる。今後、BIACORE を用いたりガンドとの親和性を測定するなど、抗体自体の機能解析も詳細に検討する必要があるものと思われる。

作製した rchIL-6 は、はじめにニワトリハイブリドーマ HUC2-13 および IL-6 依

存性マウスハイブリドーマ MH60 に対する細胞増殖促進効果の測定を行うことで、細胞増殖の面における有効性を検討した。その結果、rchIL-6 は、濃度依存的に MH60 の細胞増殖を促進したが、HUC2-13 に対しては全く細胞増殖を促進しなかった。この原因の一つとして、両ハイブリドーマの IL-6 に対する依存度の違いが考えられる。MH60 は、樹立される過程で、IL-6 を含まない増殖培地中では、血清存在下であっても全く増殖することができない性質を獲得したハイブリドーマである。これに対して HUC2-13 は、樹立時に chIL-6 の存在しない増殖培地、つまり FBS 添加のみで増殖できる性質を獲得したハイブリドーマである。この樹立時における両ハイブリドーマの IL-6 に対する感受性の違いが、依存度の差となって現れたものと考えられる。しかし、ニワトリとマウスの IL-6 のアミノ酸レベルでの相同性は 30% 未満であり、chIL-6 がマウスハイブリドーマである MH60 に対して細胞増殖活性を発揮した理由は明瞭ではない。しかし、ニワトリ（鳥類）と哺乳動物間の相同分子は、アミノ酸の相同性が低くても、システイン残基などの立体構造の形成に重要なアミノ酸が保存されている場合が多く、類似した立体構造を形成していると考えられる。IL-6 も、ニワトリとマウスで 4 ヶ所のシステイン残基が完全に保存されていることから、やはり類似した立体構造を形成するものと思われ、その結果 MH60 上の IL-6 レセプターが chIL-6 の立体構造を認識することで結合できたものと思われる。

rchIL-6 は、HUC2-13 に対して細胞増殖を促進しなかったが、HUC2-13 の rchIL-6 に対する応答性を検討するために、rchIL-6 添加後の HUC2-13 細胞内シグナル伝達分子のリン酸化に注目した。哺乳類において、IL-6 のシグナルは主に JAK/STAT および Ras-MAPK 経路で制御されている [66]。Ras-MAPK 経路は、多くのサイトカイン・増殖因子が共有するシグナル伝達経路であるが、序論でも述べたように、Jak-STAT 経路はサイトカインによって使用する STAT タンパクの種類が異なっている。そこで本研究では、IL-6 のシグナル伝達分子の中で最も重要な STAT3 に着目し、Ras-MAPK 経路の転写因子である MEK1/2 と共に、chIL-6 添加により HUC2-13 内でリン酸化が誘導されるかどうかウエスタンブロット解析により検討した。その結果、HUC2-13 は、rchIL-6 濃度依存的にリン酸化 STAT3 タンパク質が増加しており（図 14）、同様に、MH60 に対する試験においても STAT3 のリン酸化が誘導されていた（図 13）。これらの結果は、HUC2-13 が rchIL-6 に対して応答性を示すことを示唆しており、細胞増殖以外の面で rchIL-6 の効果が発揮される可能性が考えられた。一方、MEK1/2 のリン酸化は、HUC2-13 および MH60 共に rchIL-6 を添加しても誘導されなかった。先にも述べたように、Ras-MAPK 経路は多くのサイトカイン、増殖因子の共有するシグナル伝達経路であり、主に細胞の分化や増殖を担うことが多い [67]。CBCs では、chLIF の刺激により STAT3 と MEK1/2 の両方がリン酸化されることが報告されており [64]、STAT3 が胚盤葉細胞の未分化能維持に、MEK1/2

が細胞増殖に作用しているものと思われ、両シグナル経路がバランス良く活性化することが重要であると考えられている。しかし、HUC2-13 は分化の終了した終末 B 細胞であり、chIL-6 非依存的に *in vitro* で細胞増殖が可能である細胞株であることから、HUC2-13 では chIL-6 添加による MEK1/2 のリン酸化は誘導されないものと考えられる。

chIL-6 が HUC2-13 内 STAT3 のリン酸化を誘導した結果、chIL-6 が HUC2-13 に対して何らかの生物活性を発揮することが考えられた。序論でも述べたように、マウスでは、IL-6 非依存性であっても IL-6 により抗体産生が誘導されるハイブリドーマが報告されている。そこで、本研究では rchIL-6 添加による HUC2-13 の抗体産生能の変化を検討した。その結果、rchIL-6 は、継時的に HUC2-13 の抗体産生能をわずかではあるが向上させていた。この時点では、rchIL-6 がどの段階 (転写、翻訳レベル) で抗体分子の発現を制御しているのか明瞭ではない。しかし、マウスにおいては、IL-6 シグナルによるイムノグロブリン産生は、転写レベルで制御されていることが報告されていることから [68]、rchIL-6 による HUC2-13 における抗体産生の促進も、特定の転写因子を介して転写レベルで制御されている可能性がある。本研究では、STAT3 のシグナルと、STAT3 に関連すると考えられる転写因子の発現を検討することにより、chIL-6 による HUC2-13 抗体産生促進機構を解析する必要があると考えたが、それについては第 4 章で述べることにする。

本章では、rchIL-6 のニワトリハイブリドーマ HUC2-13 に対する効果を、細胞増殖、シグナル伝達分子のリン酸化および抗体産生の面から検討した。その結果、rchIL-6 は、IL-6 依存性マウスハイブリドーマ MH60 で認められた細胞増殖促進効果を示さなかったが、MH60 と同様に細胞内伝達分子である STAT3 のリン酸化を誘導したこと、そして抗体産生量をわずかではあるが向上させることがわかった。しかし、両ハイブリドーマで検出されたチロシンリン酸化 STAT3 が、rchIL-6 同濃度条件下で比較すると、HUC2-13 よりも MH60 の方が多い結果であったこと (図 13 および図 14)、また、マウスハイブリドーマの抗体産生能は、IL-6 刺激によって 3-4 倍向上することが報告されていることから [14]、rchIL-6 のニワトリハイブリドーマに対する抗体産生促進効果は不十分であると考えられる。この原因は、ニワトリ、マウスハイブリドーマの IL-6 に対する根本的な感受性の違いによるものである可能性も考えられるが、その感受性を決定する要因の一つとしては、細胞表面にある IL-6R の発現量にあると想像される。IL-6 のシグナル伝達は、IL-6、リガンド特異的な IL-6R α およびシグナル伝達受容体である gp130 からなる 6 量体形成が必須であるが、その第一段階である IL-6 と IL-6R α との会合が起これないと、以降の gp130 との複合体形成は起これない。つまり、IL-6 のシグナルは、第一に特異的レセプターである IL-6R α の発現に依存してくると予想される。哺乳類では、gp130 は様々な組織、

細胞に広範囲にわたって発現しているが [69], IL-6R α の発現はより限局されていることから [70], gp130 を発現している組織や細胞が, 必ずしも IL-6 に対して応答性を示さないことがある. ニワトリに関しては, 当研究室において, 様々なニワトリ組織や細胞株を用いてニワトリ gp130 (chgp130) の発現解析を行った結果, HUC2-13 やファブリキウス嚢などの B 細胞系で強く発現しているものの, chgp130 は供試した全ての組織および細胞株で発現が確認された [71] ことから, 哺乳類 gp130 と類似した発現様式であることが示唆された. しかし, ニワトリ IL-6R α (chIL-6R α) に関しては, クローニングの報告すらないのが現状である. そこで次章では, chIL-6R α の遺伝子クローニングを行い, 特にニワトリハイブリドーマにおける発現に注目し, ニワトリ各組織および細胞株における発現解析を試みることにした.

第3章

ニワトリ IL-6 レセプターの解析

3.1 序論

第 2 章では、rchIL-6 の HUC2-13 培養系への有効性を、細胞増殖促進効果、抗体産生促進効果および IL-6 の細胞内シグナル伝達分子である STAT3 および MEK1/2 のリン酸化の面から検討した。その結果、rchIL-6 は、ニワトリハイブリドーマ HUC2-13 に対して、IL-6 依存性マウスハイブリドーマ MH60 で認められた細胞増殖促進活性を示さなかったが、抗体産生量をわずかに上昇させる効果があることがわかった。また、rchIL-6 刺激によって HUC2-13 内の STAT3 のリン酸化が誘導されることが判明し、rchIL-6 が HUC2-13 の培養系に有効利用できる因子であることが示唆された。しかし、rchIL-6 添加後の HUC2-13 内のリン酸化 STAT3 タンパク質の量は、rchIL-6 同濃度条件下の MH60 内リン酸化 STAT3 タンパク質の量よりも少なかったこと、またマウスハイブリドーマで認められるほどの抗体産生量の向上が認められなかったことから、HUC2-13 に対する rchIL-6 の活性は十分なものではないことが示唆された。IL-6 のシグナル伝達の際は、IL-6 が IL-6 特異的受容体である IL-6R と、シグナル伝達受容体である gp130 と複合体を形成する必要がある、この両者の発現量がシグナルの強さを制御していると予想される。ニワトリでは、gp130 のクローニングは報告されているが、IL-6R は未解析のままであった。よって、今後 rchIL-6 のニワトリハイブリドーマに対する有効性の検討およびに chIL-6 シグナル機構を解析していくためには、IL-6R の解析が必要であると考えられた。

そこで本章では、分子生物学的手法を用いてニワトリ IL-6R 相同分子のクローニングを行い、特にニワトリハイブリドーマに着目して、各種ニワトリ組織および各種細胞株における発現解析を行った。

3.2 材料と方法

(1) ニワトリ各組織および供試細胞株

ニワトリ各組織 (脳, 心臓, 肺, 肝臓, 筋胃, 膵臓, 脾臓, 腎臓, 胸腺, 骨髄, 卵巣およびファブリキウス嚢) は, 18 ヶ月齢の近交系ニワトリ H-B15 から調製した. また, ニワトリ精巣は, 4 ヶ月齢の H-B15 から調製した. 各組織は, シャーレ上で細切後, ホモジナイザーを用いてさらに均一化し, (2) の全 RNA の抽出に供試した.

ニワトリおよびマウス各細胞株は, HUC2-13, ニワトリ細胞融合用親株 MuH1 および MS12A [72], HD11, ニワトリ単球性白血病細胞株 IN24 [73], ニワトリ肝細胞株 LMH [74], 当研究室で樹立したヒト PrP の 122-230 残基を認識するモノクローナル抗体産生マウスハイブリドーマ 17H5 および当研究室で樹立したマウス PrP の 121-231 残基を認識するモノクローナル抗体産生マウスハイブリドーマ 2H9 [75] を供試した. HUC2-13, MuH1, MS12A, HD11 および IN24 は, 10% FBS 添加 IMDM 中で, 38.5°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養維持した. LMH は, 10% FBS 添加 Waymouth's MB752/1 medium (Invitrogen) 中で, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養維持した. 2H9 は, 10% FBS 添加 IMDM 中で, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養維持した. 17H5 は, IL-6 要求性株であることから, 2H9 の増殖培地を基本培地として, さらに HCF を 10% 添加したものを準備し, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養維持した.

(2) 全 RNA の抽出

全てのニワトリ組織および細胞株からの全 RNA は, 第 2 章の材料と方法 (2)-a に準じて TRIzol 試薬を用いて抽出した.

(3) chIL-6R 遺伝子の完全長クローニング

chIL-6R 遺伝子の完全長クローニングは, 3' および 5' RACE 法により行った. 3' RACE は, 3'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) を用いて, また 5' RACE は, 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends ver. 2.0 (Invitrogen) を用いて, それぞれキット添付のプロトコルに従って行った. なお, 3' および 5' RACE に用いた遺伝子特異的プライマー (GSP) は, Delaware Biotechnology Institute 内のニワトリ EST データベース (<http://chick.umist.ac.uk/>) に登録されてい

る EST 配列 (accession number 005852. 1) を元に作製した. なお, 本章で使用した全てのプライマーの塩基配列は表 9 に示した.

a. 3' RACE

3' RACE は, KOD plus を用いた PCR 法により行った. 本章の (2) で抽出した LMH 全 RNA 4 μg に対して, キット添付の 10 μM poly (dT) アダプタープライマーを 1 μl 加え, SuperScript III を用いた逆転写反応により 3' RACE 用 cDNA を合成した. cDNA 合成は, 第 2 章の材料と方法 (2)-b に準じて行った. PCR 反応は, 3' GSP1 と, poly (dT) アダプタープライマーに相補的な Universal Amplification Primer (UAP) を用いて, 94°C, 3 分間の加熱の後に, 94°C, 15 秒間 (熱変性), 67°C, 30 秒間 (プライマーのアニーリング) および 68°C, 2 分間 (伸長反応) を 1 サイクルとして 35 サイクル行い, 最後に 68°C, 2 分間反応させた. なお, サーマルサイクラーは ABI 9700 (Applied Biosciences) を使用し, PCR 反応の組成は表 10 に示した. 増幅した遺伝子断片は, Gel extraction lit を用いて精製し, 第 2 章の材料と方法 (2)-d に準じて pGEM T-Easy Vector ヘクローニング後, 宿主大腸菌 JM109 コンピテント細胞へ形質転換した. 形質転換後の大腸菌は, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン含 2x YT プレートに塗布し, 37°C で終夜培養した. 培養後に出現したコロニーは, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン含 2x YT 培地 2 ml 中で, 37°C で終夜振盪培養し, QIAprep spin Miniprep Kit を用いて大腸菌からプラスミド DNA を抽出した. 抽出したプラスミド DNA 中の挿入遺伝子の塩基配列は, Big Dye terminator ver. 3.1 cycle sequencing kit およびシーケンス用プライマー (M13F, M13R および 3' GSP2) を用いてシーケンス反応し, 以降の塩基配列の決定および解析は, 第 2 章の材料と方法 (2)-d に準じて行った.

b. 5' RACE

5' RACE は, LA-Taq polymerase (TAKARA) を用いた PCR 法により行った. 本章の (2) で抽出した LMH 全 RNA 4 μg に対して, 10 μM の 5' GSP1 を 1 μl 加え, SuperScript III を用いた逆転写反応により 5' RACE 用 cDNA を合成した. cDNA 合成は, 第 2 章の材料と方法 (2)-b に準じて行った. PCR 反応は, 5' GSP2, 5' GSP3 または 5' GSP4 と, キット添付の UAP を用いて 94°C, 2 分間の加熱の後に, 94°C, 30 秒間 (熱変性), 59°C, 30 秒間 (プライマーのアニーリング) および 72°C, 2 分間 (伸長反応) を 1 サイクルとして 35 サイクル行い, 最後に 72°C, 5 分間反応させた. なお, サーマルサイクラーは ABI 9700 を使用し, PCR 反応の組成は表 11 に示した. 反応後の PCR 産物は, 一部を 1% アガロースゲル中で電気泳動して, EtBr 染色によ

表9. 本章で使用した各プライマーの塩基配列

primer	sequence	Tm (°C)
[chIL-6R クローニング用 プライマー]		
UAP	5'-CUACUACUAGGCCACGGCTCGACTAGTAC-3'	78
AUAP	5'-GGCCACGCTCGACTAGTAC-3'	66
3' GSP1	5'-CATGCGGCACGTGGTACAGGTGA-3'	68
3' GSP2	5'-AGTCTGCTGGACATCAT-3'	60
5' GSP1	5'-CCCAAGCTCCTCTGTGCCCTCA-3'	66
5' GSP2	5'-CGCGTCACCTGGTCCACCTG-3'	68
5' GSP3	5'-CCTCCACCGTCACGTTCAGG-3'	66
5' GSP4	5'-GCACAGCAGCGTCACGTTGG-3'	66
chIL6R-1	5'-GTTCCCTAACGCCCGGTTCC-3'	62
chIL6R-2	5'-CACACCCTGAGCCAGGCC-3'	62
[発現解析 (RT-PCR) 用 プライマー]		
chIL-6R-F	5'-GTTCCCTAACGCCCGGTTCC-3'	62
chIL-6R-R	5'-CACACCCTGAGCCAGGCC-3'	64
chgp130-F	5'-GCAGATGGACAGATTGAGC-3'	60
chgp130-R	5'-TCACTACTGATCCTGTAGCG-3'	60
chactin-F	5'-TACCACAATGTACCCCTGG-3'	54
chactin-R	5'-CTCGTCTTGTATTATGGCC-3'	56
moLL-6R-F	5'-GCAAAATGGCACAGTGACAAG-3'	60
moLL-6R-R	5'-ATGTGGTATACTTTGTCACCC-3'	60
mogp130-F	5'-GATCGAGCAGAATGTATGG-3'	62
mogp130-R	5'-GACCTGGATCCAAGTTGAGG-3'	62
moactin-F	5'-AGCCATGTACGTTGCTATCC-3'	60
moactin-R	5'-AATGGTGATGACCTGGCCG-3'	60
[リアルタイム PCR 用 プライマー]		
chIL6R-RT1	5'-TGAGGATGATCCCTACGGCTATG-3'	60
chIL6R-RT2	5'-CCGGCATCATCAGCAGTGT-3'	60
bac-f	5'-CACCTTCCAGCAGATGTGGAT-3'	60
bac-r	5'-AGTCCGGTTTAGAAGCATTTGC-3'	60

表10. 3' RACE の反応液組成

組成	容量 (μl)
10 x KOD buffer	4.0
2 mM dNTPs	4.0
25 mM MgSO ₄	2.6
3' RACE GSP (10 μM)	0.8
UAP (10 μM)	0.8
3' RACE cDNA	2.0
KOD plus (1U/μl)	0.8
DW	25.0
計	40.0

表11. 5' RACE の反応液組成

組成	容量 (μl)
2 x LA GC buffer II	12.5
2.5 mM dNTPs	4.0
5' RACE GSP (10 μM)	1.0
UAP (10 μM)	1.0
5' RACE cDNA	2.5
LA Taq (5U/μl)	0.25
DW	5.25
計	25.0

り単一バンドであることを確認した後、第2章の材料と方法 (4)-b に準じて Exo I/SAP 処理して、反応液中のプライマーを完全に除去した。酵素処理後の遺伝子断片は、Big Dye terminator ver. 3.1 cycle sequencing kit および上記各 5' GSP を用いたダイレクトシーケンスによりシーケンス反応した。以降の塩基配列の決定および解析は、第2章の材料と方法 (2)-d に準じて行った。

c. chIL-6R 遺伝子の完全長の決定

chIL-6R 遺伝子の完全長の決定は、LA-Taq を用いた PCR 法により行った。本章の (2) で抽出した LMH 全 RNA 4 μg に oligo (dT)₁₅ プライマー 0.5 μg を加え、SuperScript III を用いた逆転写反応により一本鎖 cDNA を合成した。cDNA 合成は、第2章の材料と方法 (2)-b に準じて行った。PCR 反応は、合成した LMH 由来 cDNA を鋳型として、上記の 3' および 5' RACE で得られた塩基配列を元に作製したプライマー (chIL6R-1 および chIL6R-2) を用い、94°C, 2 分間の加熱の後に、94°C, 30 秒間 (熱変性), 58°C, 30 秒間 (プライマーのアニーリング) および 72°C, 2 分間 (伸長反応) を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、最後に 72°C, 5 分間反応させた。なお、サーマルサイクラーは ABI 9700 を使用し、PCR 反応の組成は表 12 に示した。反応後の PCR 産物は、一部を 1% アガロースゲル中で電気泳動して、EtBr 染色により単一バンドであることを確認した後、第2章の材料と方法 (4)-b に準じて Exo I/SAP 処理を行い、反応液中のプライマーを完全に除去した後に、Big Dye terminator ver. 3.1 cycle sequencing kit および chIL6R-1, chIL6R-2 を用いたダイレクトシーケンスによりシーケンス反応した。以降の塩基配列の決定および解析は、第2章の材料と方法 (2)-d に準じて行った。

決定した塩基配列は、GENETYX-MAC ver. 9.0 を用いてアミノ酸に変換した後に、NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて相同性検索した後に、CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment [76] を用いて異種動物間における IL-6R のアミノ酸配列を比較した。また、chIL-6R アミノ酸配列中のシグナル配列および特異的ドメインは、SignalP V2.0.b2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) [77] および SMART-Simple Modular Architecture Research Tools (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) [78, 79] をそれぞれ用いて検索した。

(4) IL-6R および gp130 mRNA の発現解析

IL-6R および gp130 mRNA の発現解析は、LA-Taq を用いた RT-PCR 法により行った。本章の (2) で抽出した各組織および各細胞株由来全 RNA 2 μg に oligo (dT)₁₅

表12. chIL-6R ORF 領域のPCR 増幅の反応液組成

組成	容量 (μ l)
2 x LA taq GC buffer II	12.5
2.5 mM dNTPs	4.0
chIL6R-1 (10 μ M)	1.0
chIL6R-2 (10 μ M)	1.0
LMH cDNA (20 ng/ μ l)	1.0
LA Taq (1U/ μ l)	0.25
DW	5.25
計	25.0

プライマー0.5 μg を加え, SuperScript III を用いた逆転写反応により一本鎖 cDNA を合成した. cDNA 合成は, 第 2 章の材料と方法 (2)-b に準じて行った. 続いて, PCR 反応は, 合成した各組織および各細胞株由来 cDNA 20 ng を鋳型として, 本章の (2)-c で決定した chIL-6R, マウス IL-6R (moIL-6R, NCBI accession number NM010559), ニワトリ gp130 (chgp130, NCBI accession number NM204871) およびマウス gp130 (mogp130, NCBI accession number M83336) の塩基配列を元に作製したプライマーを用いて, 94°C, 2 分間の加熱の後に, 94°C, 30 秒間 (熱変性), 58 (chIL-6R および mogp130)/50 (moIL-6R)/54 (chgp130)°C (プライマーのアニーリング), 30 秒間および 72°C, 2 分間 (伸長反応) を 1 サイクルとして 34 サイクル行い, 最後に 72°C, 5 分間反応させた. また, 内部標準遺伝子としてニワトリ β -actin (NCBI accession number NM205518) およびマウス β -actin (NCBI accession number BC013380) も同様にプライマーを作製し, PCR 反応した. PCR の反応条件は, 94°C, 2 分間の加熱の後に, 94°C, 30 秒間, 60°C, 30 秒間および 72°C, 2 分間を 1 サイクルとして 34 サイクル行い, 最後に 72°C, 5 分間反応させた. なお, サーマルサイクラーは全ての PCR 反応で ABI 9700 を使用し, PCR 反応の組成は表 13 に示した.

増幅したニワトリまたはマウス β -actin 遺伝子断片を含む PCR 反応液は, 1% アガロースゲル中で電気泳動した後, ゲルを 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EtBr 含 TAE 緩衝液中で 30 分間染色し, その後 TAE 中で 10 分間洗浄した. 各 PCR 反応液中の β -actin 増幅断片は, LAS-3000 内の Image Gauge ver. 4.0 (富士フイルム) を用いて, 機器添付のプロトコルに従って定量し, 定量結果を元に IL-6R および gp130 増幅断片を含む PCR 反応液のゲルへのアプライ量を決定した. IL-6R, gp130 および β -actin 増幅断片を含む PCR 反応液は, 決定した添加量を泳動後, 同様に染色および洗浄操作を経て, LAS-3000 を用いてバンドを検出した.

(5) chIL-6R mRNA の定量的解析

chIL-6R mRNA の定量的解析は, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いたリアルタイム PCR 法により行った. 本章の材料と方法 (2) で抽出した心臓, 肝臓, 脾臓, 胸腺, 骨髄, ファブリキウス嚢, 精巣, HUC2-13, HD11, IN24 および LMH 由来全 RNA 2 μg を用いて, 第 2 章の材料と方法 (2)-b に準じて 1 本鎖 cDNA を合成後, *E. coli* DNA Polymerase I (TAKARA) を用いて, Okayama-Berg 法 [80] に従って 2 本鎖 cDNA を合成した. リアルタイム PCR に用いたプライマー (chIL6R-RT1, chIL6R-RT2) は, chIL-6R の塩基配列を元に, Primer Express ver. 1.5 (Applied Biosystems) を用いて作製した. PCR 反応は, 50 ng の 2 本鎖 cDNA を鋳型として, 95°C, 10 分間の加熱の後に, 95°C, 15 秒間および 60°C, 1 分間を 1 サ

表13. IL-6R およびgp130 mRNA 発現解析のPCR 反応液組成

組成	容量 (μ l)
10 x LA buffer	2.5
2.5 mM dNTPs	2.5
25 mM MgCl ₂	1.5
発現解析用5' primer (10 μ M)	1.0
発現解析用3' primer (10 μ M)	1.0
cDNA (10 ng/ μ l)	2.0
LA Taq (1 U/ μ l)	0.25
DW	14.25
計	25.0

イクルとして 40 サイクル行った。同時に、内部標準遺伝子として β -actin mRNA の PCR 反応を bac-f および bac-r プライマーを用いて同条件で行った。各 cDNA 中の標的遺伝子の初期濃度は、5 倍段階希釈で調整した chIL-6R または β -actin プラスミド DNA (2.0×10^{-2} , 4.0×10^{-3} , 8.0×10^{-4} , 1.6×10^{-4} , 3.2×10^{-5} , 6.4×10^{-6} , 1.3×10^{-6} および 2.6×10^{-7} ng) を鋳型として、上記と同条件で PCR 反応した後、ABI 7700 software (Applied Biosystems) を用いて作成した検量線から算出した。なお、リアルタイム PCR における PCR 反応の組成は、表 14 に示した。

(6) ウェスタンブロット解析によるチロシンリン酸化 STAT3 の検出

原核型 rchIL-6 で刺激培養した HUC2-13 および LMH 内のチロシンリン酸化 STAT3 は、ウェスタンブロット解析により検出した。両細胞は、第 2 章の材料と方法 (5)-b に準じて、0.1-100 ng/ml の原核型 rchIL-6 で 15 分間刺激培養後、細胞を可溶化して同タンパク量を SDS-PAGE に供試した。泳動後、ブロッティングおよびブロッキングを経て、ウサギ抗マウスチロシンリン酸化 STAT3 またはウサギ抗マウス STAT3 抗体を用いて目的のタンパク質を検出した。なお、ウェスタンブロット解析の基本操作および条件は、第 2 章の材料と方法 (5)-b に準じた。

表14. リアルタイムPCR の反応液組成

組成	容量 (μ l)
2 x SYBR Green	12.5
real-time 5' primer (10 μ M)	1.5
real-time 5' primer (10 μ M)	1.5
cDNA (20 ng/ μ l) or plasmid DNA	2.5
DW	7.0
計	25.0

3.3 成績

c. chIL-6R 遺伝子のクローニング

本研究では、chIL-6R 遺伝子を LMH 由来 cDNA からクローニングした。最終的にクローニングした chIL-6R 遺伝子の模式図と、使用したプライマーの名称および位置は、図 16 に示した。また、RACE 後の全ての塩基配列の決定には、各遺伝子特異的プライマーおよび RACE 用の nested プライマー (AUAP) を用いてセカンド PCR を行った後に得た増幅産物を用いた。

はじめに、chIL-6R 遺伝子のクローニングは、ニワトリ EST のデータベースに登録されているニワトリ IL-6R 相同遺伝子の部分配列から作製したプライマー (3' GSP1) および RACE 用のアダプタープライマー (UAP) を用いて、3' RACE を行った。PCR の結果、900 bp の明瞭な増幅断片を得た。この増幅産物は、精製後にクローニング用ベクターである pGM T-easy vector へクローニングし、924 bp の塩基配列を決定した。決定した塩基配列はアダプタープライマーの 5' 側にアデニン (A) の連続した配列含んでおり、NCBI BLAST 中の BLASTN プログラムを用いて核酸データベースと照合したところ、ブタ IL-6R の塩基配列と約 47% の相同性を示す配列であることがわかった (データは示していない)。

次に、決定した 924 bp の塩基配列を元に作製したプライマー (5' GSP, 材料と方法には示していない) と UAP を用いて、LMH 由来 cDNA を鋳型に 5' RACE を行った。その結果、600 および 900 bp の明瞭な増幅断片を得た。これらの増幅産物はそれぞれ精製してダイレクトシーケンスを行い、622 および 945 bp の塩基配列を決定した。決定した各塩基配列と、先の 3' RACE 増幅産物の塩基配列を、GENETYX-MAC ver. 9.0 内の multiple alignment を用いて相同性検索したところ、各塩基配列は、5' および 3' 末端に PCR 反応に用いたプライマー配列を有していたが、プライマー以降の配列は 3' RACE 増幅産物の塩基配列と全く一致していなかった。決定した塩基配列は BLASTN プログラムを用いて核酸データベースと照合したところ、622 bp の塩基配列はニワトリミオシン重鎖遺伝子 (NCBI accession number NM204766) と完全に一致することがわかった。一方、945 bp の塩基配列は該当する既知遺伝子が存在せず、5' GSP を用いた PCR では、目的の chIL-6R 遺伝子をクローニングすることが出来なかった。そこで、再びニワトリ EST のデータベースの塩基配列を元に作製したプライマー (5' GSP2) および UAP を用いて 5' RACE を行ったところ、250 bp の明瞭な増幅断片を得た。この増幅産物は精製してダイレクトシーケンスを行い、262 bp の塩基配列を決定した。決定した 262 bp の塩基配列と EST の塩基配列を、multiple alignment を用いて相同性検索を行ったところ、プライマー以降の配列で 88 bp 完全

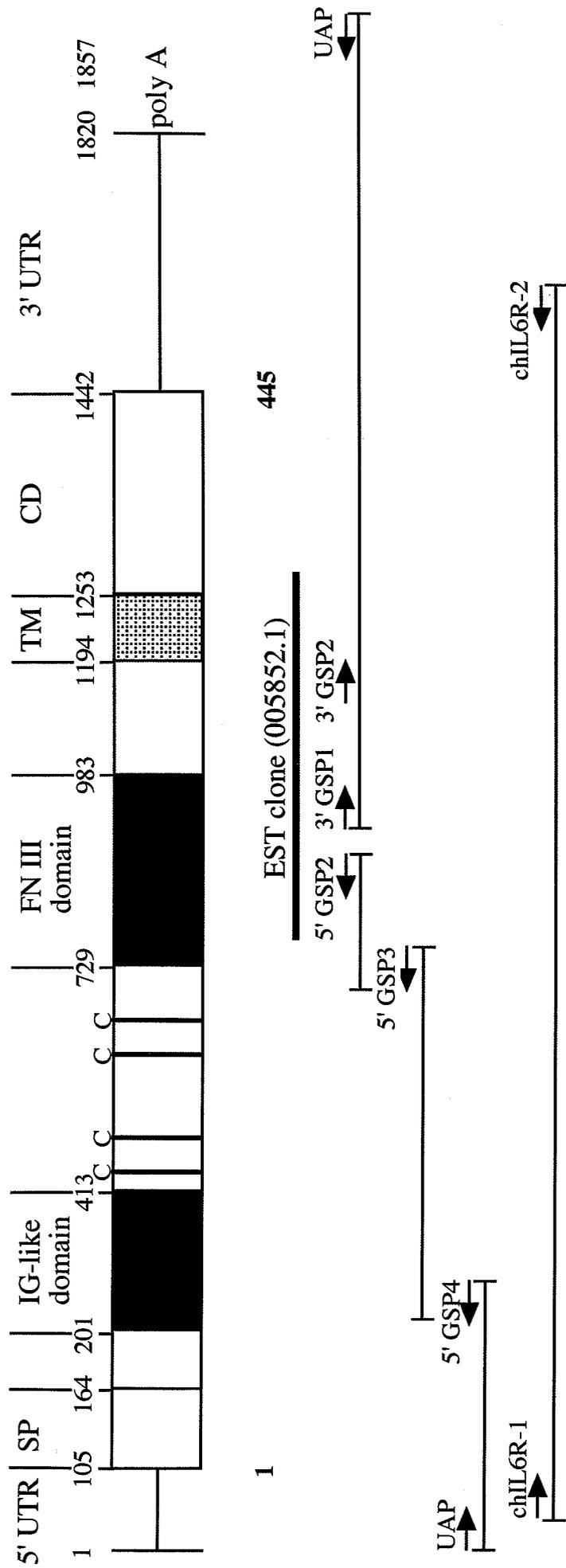


図16. ニワトリIL-6レセプター遺伝子および使用したプライマーの位置を示す模式図

- SP ; シグナル配列
- C ; I型サイトカインレセプターに特徴的なシステイン残基
- TM ; 膜貫通領域
- CD ; 細胞内領域

に重なり合っており、5' 上流側にさらに 175 bp 伸長していた。続いて、この 175 bp の塩基配列を元に作製したプライマー (5' GSP3) および UAP を用いて 2 回目の 5' RACE を行った。その結果、650 bp の明瞭な増幅断片を得た。この増幅産物は精製してダイレクトシーケンスを行い、631 bp の塩基配列を決定した。決定した 631 bp の塩基配列と先の 262 bp の塩基配列を、multiple alignment を用いて相同性検索を行ったところ、5' 上流側にさらに 369 bp の伸長が認められた。さらに、この 369 bp の塩基配列を元に作製したプライマー (5' GSP4) および UAP を用いて 3 回目の 5' RACE を行ったところ、300 bp の明瞭な増幅断片を得た。この増幅産物は精製してダイレクトシーケンスを行い、288 bp の塩基配列を決定した。決定した 288 bp の塩基配列と先の 369 bp の塩基配列を、multiple alignment を用いて相同性検索を行ったところ、5' 上流側にさらに 164 bp の伸長が認められた。最終的に、5' RACE によって 872 bp の増幅産物を得た。

最後に、3' および 5' RACE から得た塩基配列を元に作製したプライマー (chIL6R-1 および chIL6R-2) を用いて、PCR した結果、約 1.5 kbp の明瞭な増幅断片を得た。この増幅産物は精製してダイレクトシーケンスを行い、1481 bp の塩基配列を決定した。決定した 1481 bp の塩基配列は、EST データベース上の塩基配列、924 bp の 3' RACE 増幅断片および 872 bp の 5' RACE 増幅断片と共に multiple alignment を用いて相同性検索したところ、図 16 に示すように全ての遺伝子断片がオーバーラップしており、1857 bp の chIL-6R 完全長 cDNA が決定された。

d. chIL-6R cDNA の特徴

決定した chIL-6R 完全長 cDNA の塩基配列と、そこから予想されるアミノ酸配列を図 17 に示した。chIL-6R の翻訳領域 (open reading frame; ORF) は、GENETYX-MAC ver. 9.0 を用いて検索したところ、予想される chIL-6R のアミノ酸は 445 アミノ酸であることがわかった。決定した 445 アミノ酸は、NCBI BLAST 内の BLASTP を用いてデータベース上の既知配列との相同性を検索した。その結果、chIL-6R はブタ IL-6R と最も高い相同性を示していた (Z score; 226, expected value; 9.0×10^{-58} , identities; 41%, positive; 55%)。chIL-6R cDNA は、1335 bp の ORF, 104 bp の 5' 非翻訳領域 (5' untranslated region; 5'-UTR) および 415 bp の 3'-UTR から成り立っており、開始コドンの上流および下流には、'CGGATG' というコザック配列 (cozak sequence) に類似した配列が認められた。5'- および 3'-UTR では、長いもので G または C が 10 塩基以上連続した特徴的な配列が複数認められ、その出現頻度は特に 3'-UTR で高いことがわかった。3' 末端には、poly (A) テイルと思われる A の連続した配列が認められ、その 20 塩基上流の位置に 'aataaa' というポリ A 付加シグナル配列

1 5' -gagtgcacgtgcggggcccccgcac
 29 cgcgttcttaacgcgcggttccgcccgatgctccgctgcgctccggggggttcggagctccgctctccccccgcg

105 ATG GCG CGG CCC CCG GGG CTG CTC CGC GCC GCG CTG CTC CTC CTC ACC GOC GCC TCC TCC
 M A R P P G L L R A A L L L L L T A A S S

165 GCG CCC CGA CGG CGC TGC GGC CCC GTG GCG CTG CCG CAG GAC ACG GTG CTG GGC CGC CCC
 A P R R R C G P V A L P Q D T V L G R P

225 GGA GCC AAC GTG ACG CTG CTG TGC CGG GAA CGG GAG CCG CCC AAC GGC ACC GTG CTG TGG
 G A N V T L L C R E R E P P N G T V L W

285 TCT GGG AGG CGG AGG GCG CTG GGG GGG GGC AAC GCG CTG CTG CTG GGG GGG CTG CGG CCG
 S G R R R A L G G G N A L L L G G L R P

345 GAG GAC GCC GGG CGG TAC AGC TGC CAC CTG GGG GGT CAC ACG CTG CGC ACC GTG CGC CTG
 E D A G R Y S C H L G G H T L R T V R L

405 CTG GTG GAA GAG CCC CCC GAG CCC CCC CAC GTT TCC TGC TCC CGG CGC ACC CAC GAC AAA
 L V E E P P E P P H V S C S R R S H D K

465 GAT GTG CTC TGC GAG TGG CGG CCG CGC GCA TCG CCG GCT CCG GGC ACG CGA GCG GTG CTA
 D V L C E W R P R A S P A P G T R A V L

525 TGG ATG AAG CGC AGG TTC ACA ATG GAG AAC GCG ACG GAG CAG CGG TGC CAC TTC TAC TCC
 W M K R R F T M E N A T E Q R C H F Y S

585 GCG GCG CAG AAA TTC GTC TGC CGG GTG AAG GTT CCG CCC GGC ACC GAC GAC ACC AAA GCC
 A A Q K F V C R V K V P P G T D D T K A

645 CTC GTG GTG TCC GTC TGC GTC AGC AGC CGC GCG GGG AGC GCC GCC GCG GAG GAC CGC ATC
 L V V S V C V S S R A G S A A A E D R I

705 TTC ACC CTC AAT GGC ATC CTG AAG CCG GAC CCC CCC CTG AAC GTG ACG GTG GAG GCA GTG
 F T L N G I L K P D P P L N V T V E A V

765 GAG CGT TCC CCA CAG CGG CTG TGC GTG CGC TGG AGT TAC CCC CCC TCC TGG GAC CCC CGC
 E R S P Q R L C V R W S Y P P S W D P R

825 TTC TAT TGG CTG CGC TTC CAG GTG CGC TAC GCG CCC GAG CCG GCC CCG AAC TTC ACC CAG
 F Y W L R F Q V R Y R P E P A P N F T Q

885 GTG GAC CAG GTG ACG CGG ACG TGG TTG GAC ATC CGT GAT GCC TGG CGT GGC ATG CGG CAC
 V D Q V T R T W L D I R D A W R G M R H

945 GTG GTA CAG GTG AGG GCA CAG GAG GAG TTT GGG CAC GGA CCG TGG AGC GAA TGG AGC CGG
 V V Q V R A Q E E F G H G A W S E W S R

1005 GAG GCG GTG GGC ACC CCC TGG ACA GAG CCC CGG GAT GTC ACG GAG ATG GGG CTC TAC AGC
 E A V G T P W T E P R D V T E M G L Y S

1065 TCG CAG TTC CCT GCT GAG GAT GAT CCC TAC GGC TAT GGG GCC ACG CTG CCG CCC GAG CTC
 S Q F P A E D D P Y G Y G A T L P P E L

1125 TTT GGT GAT GAC ACT GCT GAT GAT GCC GGG GGA GCT GTA CTG GAG GCC GOC GTC CGC TCC
 F G D D T A D D A G G A V L E A A V R S

1185 CCC ACG TCC CCC TAC GCC CTC CTG GTG GCG GGG GGC AGT CTG CTG CTG GOC ATC ATC CTC
 P T S P Y A L L V A G G S L L L A I I L

1245 TGC TTC GCC ATA GGG ATG AGG TAC AAA CAG AGG GCA CGG GCA CAG CGG GGG GCG AAG CTG
 C F A I G M R Y K Q R A R A Q R G A K L

1305 GAG GGT GGG GGG CAG CAC CCA ATG GTA CCC CTT TGC CCC CCT GGT TCC CCG CTG AGT GCC
 E G G G Q H P M V P L C P P G S P L S A

1365 ACC CCC CTG CTG TCG CCC GCT GCC CCC CCC GGG CCT CTC CAT GTC ACC AAT TTG GAT TAT
 T P L L S P A A P P G P L H V T N L D Y

1425 TTC CTC TCG GGA AAG TAA ctgagggggggggagcagtgcaggcagctctcccacccccctggctgaggcct
 F L S G K *

1499 ggctcaggggtgtgcctccccccgcaccgggggcatcgacatccctatggggatccagcctggggggcccttactgtgt
 1578 cccggggggggcagctccaggccacggccaagctggaagcactggagcgtgagaacaggctggatttggttcgga
 1657 gtggccacagggaggggtgagccccccctcaatgcccggggggggggttttgagggtccggctggatcggeccc
 1736 atcccactgcacgcagaggggatgtgtgtgtgggggggtccttttgaaagccctcccaataaaggcgggggtg
 1815 attttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa-3'

IG

FN III

図17. ニワトリ IL-6 レセプター α 鎖の塩基配列と、そこから予想されるアミノ酸配列
 太線と矢印 ; シグナル配列とその切断点
 細線 ; 潜在的なアスパラギン型糖鎖付加部位 (NXS/T)
 太字 ; I型サイトカインレセプターに特徴的なシステイン残基, WSXWSモチーフ
 およびポリアデニレーションシグナル
 破線 ; 膜貫通領域

(polyadenylation signal sequence) が認められた (図 17, 太字). なお, 本章で得られた chIL-6R cDNA の塩基配列は, DDBJ/EMBL/NCBI のデータベースに, accession number AB175664 で登録した.

予想されるアミノ酸配列の特徴としては, 潜在的なアスパラギン型糖鎖付加部位として知られるアミノ酸配列 [Asn-X-Ser または Asn-X-Thr (NXS/T)] が, 43-45, 55-57, 150-152, 214-216 および 257-259 残基に合計 5 ヶ所認められた (図 17, 細線). また, I 型サイトカインレセプターファミリーに特徴的なアミノ酸配列 [Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS モチーフ)] [21] が, 295-299 残基に認められた (図 17, 太字). 次に, 予想されるアミノ酸配列から, N 末端側のシグナル配列を SignalP V2.0.b2 内の Hidden Markov models (HMM) [81] を用いて予想したところ, 20 残基目の Ser と 21 残基目の Ala の間がシグナルペプチダーゼで切断されやすいことがわかり, chIL-6R のシグナル配列は 20 アミノ酸からなることがわかった (図 17, 太線と矢印). さらに, chIL-6R アミノ酸配列中の特徴的なドメインを, SMART-Simple Modular Architecture Research Tools を用いて検索したところ, 364-386 アミノ酸が膜貫通領域であることがわかり (図 17, 破線), 1-363 アミノ酸が細胞外領域, 387-445 アミノ酸が細胞内領域であることがわかった. 細胞外領域に関しては, 32-103 残基がイムノグロブリン様ドメイン (IG) であり (図 17, N 末端側の□内), また 209-293 残基がフィブロネクチン III 型ドメイン (FN III) (図 17, C 末端側の□内) であり, 363 残基と哺乳類 IL-6R とほぼ同じ長さであることがわかった. 細胞内領域に関しては, 59 残基と哺乳類 IL-6R よりも約 20 残基短かったものの, 哺乳類 IL-6R と同様に, 他のサイトカインレセプターに見られるチロシンキナーゼドメインは認められなかった.

e. 異種動物間における IL-6R アミノ酸配列の比較

本章でクローニングした chIL-6R cDNA の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を, 既知の異種哺乳類由来 IL-6R アミノ酸配列と比較した. ニワトリと, ヒト (NCBI accession number NP000556), ブタ (NCBI accession number NP999568) およびマウス (NCBI accession number P22272) IL-6R を CRISTAL X (1.81) を用いて相同性を比較した. その結果, 図 18 に示すように, シグナル配列の長さは異種動物間で異なっており, ヒトおよびブタで 15 アミノ酸, マウスおよびニワトリで 20 アミノ酸の長さであった (図 18, 太線). また, IG ドメインと FN III ドメインの間に存在する, I 型サイトカインレセプターファミリーに特徴的な 4 ヶ所のシステイン残基 (図 18, ▼) を含めて, 成熟型 IL-6R に存在する 9 ヶ所のシステイン残基が, ニワトリでも完全に保存されていた. 潜在的な N 型糖鎖付加部位に関しては, ヒトおよびブタで 4 ヶ所, ニワトリおよびマウスで 5 ヶ所保存されており, ニワトリ 55-57 残基に相当す

る部位はすべての異種動物間で保存されていたが (図 16, ▼▼▼), 他の N 型糖鎖付加部位に関しては, 異種動物間で存在箇所が異なっていた. I 型サイトカインレセプターファミリーに特徴的な WSXWS モチーフ (図 16, □) は, 全ての動物種間で保存されていた. 加えて, ヒト IL-6R の解析から明らかになっている, リガンドとの結合に重要なアミノ酸である Glu²⁹⁷, Phe²⁹⁸, Gly²⁹⁹ および Gly³⁰⁰ [82, 83] が, ニワトリでも完全に保存されていた (図 18, #). 細胞外領域は, 全ての動物種間で 363 アミノ酸と全く同じ長さであったが, 細胞内領域に関しては, ヒトで 82 アミノ酸, マウスで 75 アミノ酸およびブタで 81 アミノ酸なのに対し, ニワトリは 59 アミノ酸と哺乳類 IL-6R に比べてそれぞれ 23, 16 および 22 アミノ酸短いことがわかった.

次に, 異種動物間における IL-6R のアミノ酸配列の相同性および類似性 (%) を比較した. その結果, 表 15 および表 16 に示すように, chIL-6R アミノ酸配列は, 前駆体および成熟体のいずれも, 哺乳類 IL-6R アミノ酸配列と 36-41% の相同性を示し, 異種哺乳類間での 50-75% の値に比べて相同性は低かった. しかし, 前駆体および成熟体のいずれの chIL-6R も, 哺乳類 IL-6R と 53-55% の類似性を示していた. また, リガンドとの結合に重要な領域である FN III ドメインに関しては, 哺乳類 IL-6R の FN III ドメインと 48-55% の相同性, 64-67% の類似性を示し, 前駆体および成熟体での値よりもいずれも 10% 以上高い相同性および類似性を示した (表 17).

f. ニワトリ各組織における chIL-6R mRNA の発現解析

本研究でクローニングした chIL-6R mRNA の発現は, 種々のニワトリ各組織由来 cDNA を用いて RT-PCR 法により解析した. 解析は, 内部標準遺伝子として用いた β -actin mRNA の PCR 反応による発現量をもとに cDNA 量を統一し, 各組織間における chIL-6R mRNA の発現量を比較した.

その結果, 図 19 に示すように, 各ニワトリ組織における chIL-6R mRNA の発現は, 肝臓および精巣で最も強い発現が認められ, 次いで脾臓および胸腺においてもある程度の強い発現が認められた. また, 心臓, 肺, 腎臓, 骨髄およびファブリキウス嚢では, 弱い発現が認められた. 一方, 脳, 筋胃, 膵臓および卵巣では, chIL-6R mRNA のバンドが検出されなかった. そこで, PCR 産物がプラトーに達する PCR サイクル 40 で増幅した場合, 脳において非常に微弱なバンドが検出され, 脳では弱いながらも chIL-6R が発現していることがわかった (データは示していない). しかし, 筋胃, 膵臓および卵巣では, 本サイクル数で PCR 反応を行っても全くバンドが検出されなかった.

表15. 異種動物間でのIL-6R 前駆体の相同性 (類似性)

	ヒト	ブタ	マウス
ニワトリ	40 (54)	41 (55)	36 (53)
ヒト	-	75 (83)	53 (67)
ブタ	-	-	50 (62)
マウス	-	-	-

(数字は%を示す)

表16. 異種動物間でのIL-6R 成熟体の相同性 (類似性)

	ヒト	ブタ	マウス
ニワトリ	41 (54)	41 (55)	36 (53)
ヒト	-	75 (83)	50 (62)
ブタ	-	-	49 (62)
マウス	-	-	-

(数字は%を示す)

表17. 異種動物間でのIL-6R FN III ドメインの相同性 (類似性)

	ヒト	ブタ	マウス
ニワトリ	53 (63)	55 (67)	48 (64)
ヒト	-	88 (93)	54 (72)
ブタ	-	-	53 (69)
マウス	-	-	-

(数字は%を示す)

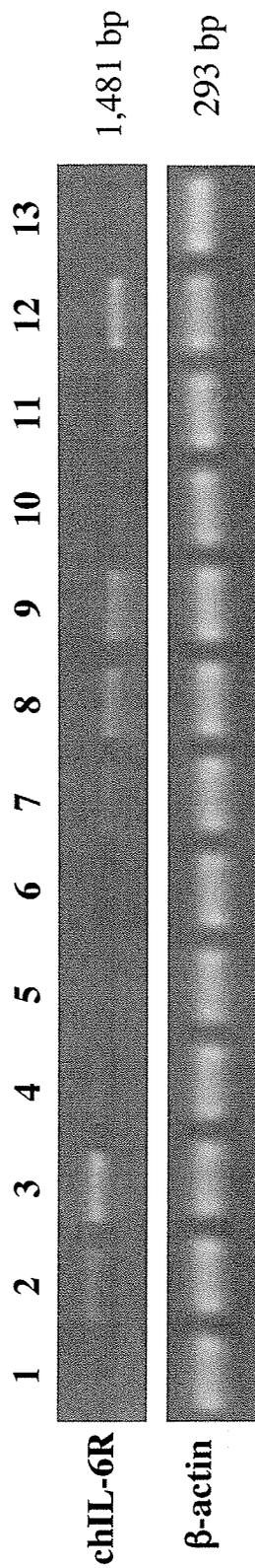


図19. ニワトリ各組織におけるchIL-6R mRNA の発現解析

レーン1	; 脳	レーン8	; 脾臓
レーン2	; 心臓	レーン9	; 胸腺
レーン3	; 肝臓	レーン10	; 骨髄
レーン4	; 肺	レーン11	; フアブリキウス嚢
レーン5	; 筋胃	レーン12	; 精巣
レーン6	; 膝臓	レーン13	; 卵巣
レーン7	; 腎臓		

(5) 各ニワトリ, マウス細胞株における IL-6R および gp130 mRNA の発現解析

各種ニワトリ細胞株 (MuH1, HUC2-13, MS12A, HD11, IN24 および LMH) およびマウス細胞株 (17H5 および 2H9) における IL-6R および gp130 mRNA の発現は, ニワトリ組織と同様, RT-PCR 法により解析した. 解析は, 内部標準遺伝子として用いたニワトリまたはマウス β -actin mRNA の PCR 反応による増幅量をもとに cDNA 量を統一し, ニワトリ, マウス各細胞株における IL-6R および gp130 mRNA の発現量を比較した.

その結果, chIL-6R mRNA は, LMH で最も強く発現していた. また, HD11, IN24 でも chIL-6R mRNA が強く発現していた. しかし, MuH1, HUC2-13 および MS12A では, chIL-6R mRNA の発現は認められたが, その発現量は前 3 者のニワトリ細胞株に比べて弱いシグナルであった (図 20, 上段パネル). 一方, chgp130 mRNA は, MuH1, HUC2-13 および MS12A で同程度の非常に強い発現が認められた. また, LMH では, 比較的強い発現が認められた. しかし, HD11 および IN24 では, 他の細胞株に比べて微弱な発現であった (図 20, 中段パネル). 一方, moIL-6R mRNA は, 17H5 および 2H9 共にある程度の発現が認められ, 両細胞株での発現量に有意な差は認められなかった (図 18, 上段パネル). また, mogp130 mRNA は, 両細胞株において, 同程度の非常に強い発現が認められた (図 20, 中段パネル).

PCR 反応におけるニワトリおよびマウスの IL-6R mRNA 発現量は, LAS 3000 内の Image Gauge ver. 4.0 を用いて定量し, 同様に定量した gp130 mRNA の発現量を 1 としたときの相対値として数値化した. その結果, 図 21 に示すように, ニワトリでは MuH1, HUC2-13 および MS12A の場合, それぞれ 0.067, 0.087 および 0.13 と低い値であったのに対し, HD11, IN24 および LMH の場合は, それぞれ 2.0, 4.9 および 2.5 と高い値であり, 前述の 3 細胞株とは全く逆の発現パターンを示していた. 一方, マウスでは, 17H5 および 2H9 でそれぞれ 0.308 および 0.34 であり, HUC2-13 類似した発現様式であったが, 両細胞株における IL-6R mRNA 発現量 (相対値) は, HUC2-13 に比べてそれぞれ 3.54 および 3.91 倍であった.

(6) リアルタイム PCR による chIL-6R mRNA の定量的解析

chIL-6R mRNA の定量的解析は, 材料と方法に示すようにリアルタイム PCR により行い, 各組織および細胞株における発現量は, ファブリキウス囊における発現量を 1 としたときの相対値として算出した. その結果, 組織では, 図 22 に示すように肝臓で最も高い発現を示し (40.3), 次いで心臓 (27.6), 胸腺 (8.7), 骨髄 (8.3) および脾臓 (1.5) の順に発現していた. また, 細胞株に関しては, IN24 で最も発現量が

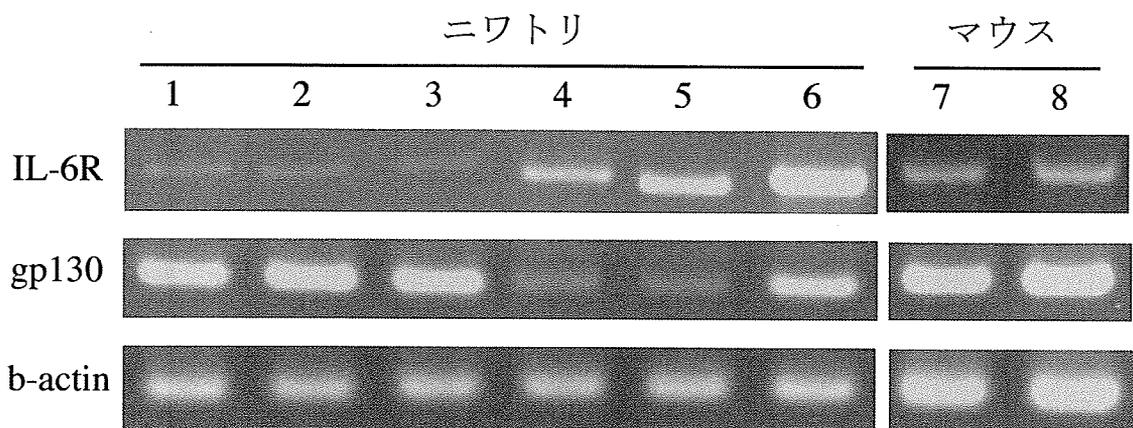


図20. ニワトリおよびマウス各細胞株におけるIL-6R, gp130 mRNA の発現解析

- レーン1 ; MS12A (ニワトリ細胞融合用親株)
- レーン2 ; MuH1 (ニワトリ細胞融合用親株)
- レーン3 ; HUC2-13 (ニワトリハイブリドーマ)
- レーン4 ; HD11 (ニワトリマクロファージ様細胞株)
- レーン5 ; IN24 (ニワトリ単球性白血病細胞株)
- レーン6 ; LMH (ニワトリ肝細胞株)

- レーン7 ; 17H5 (IL-6 依存性マウスハイブリドーマ)
- レーン8 ; 2H9 (IL-6 非依存性マウスハイブリドーマ)

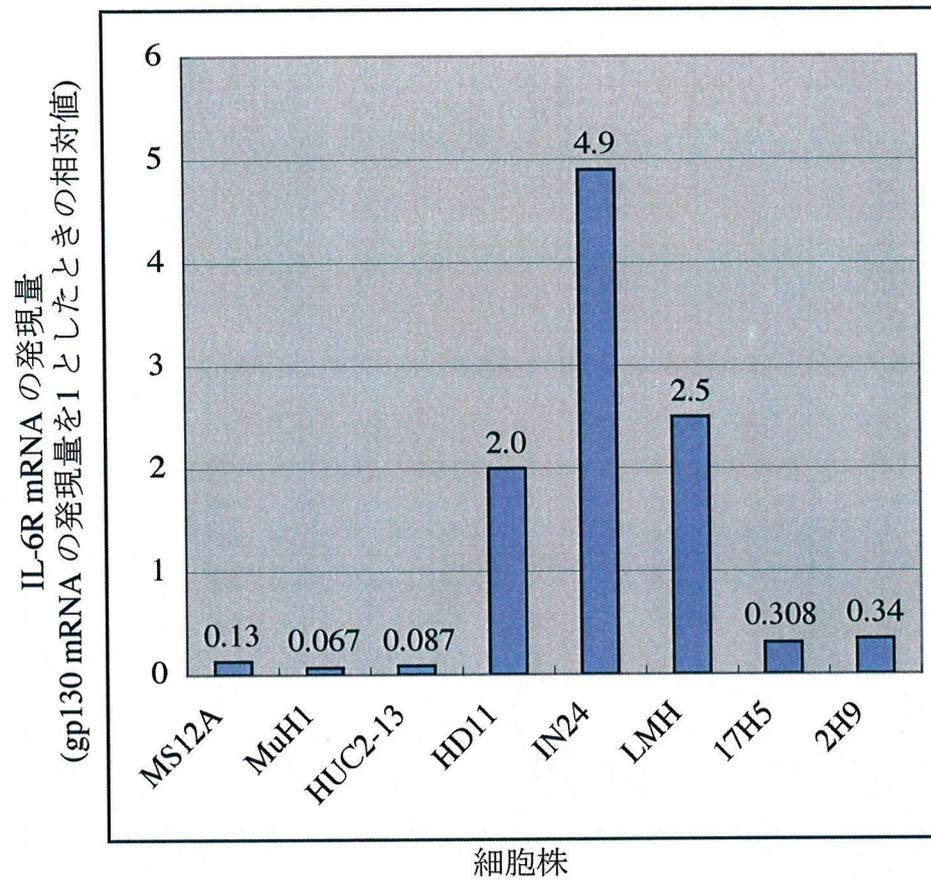


図21. 各ニワトリ細胞株におけるgp130 mRNA に対するIL-6R mRNA の発現量

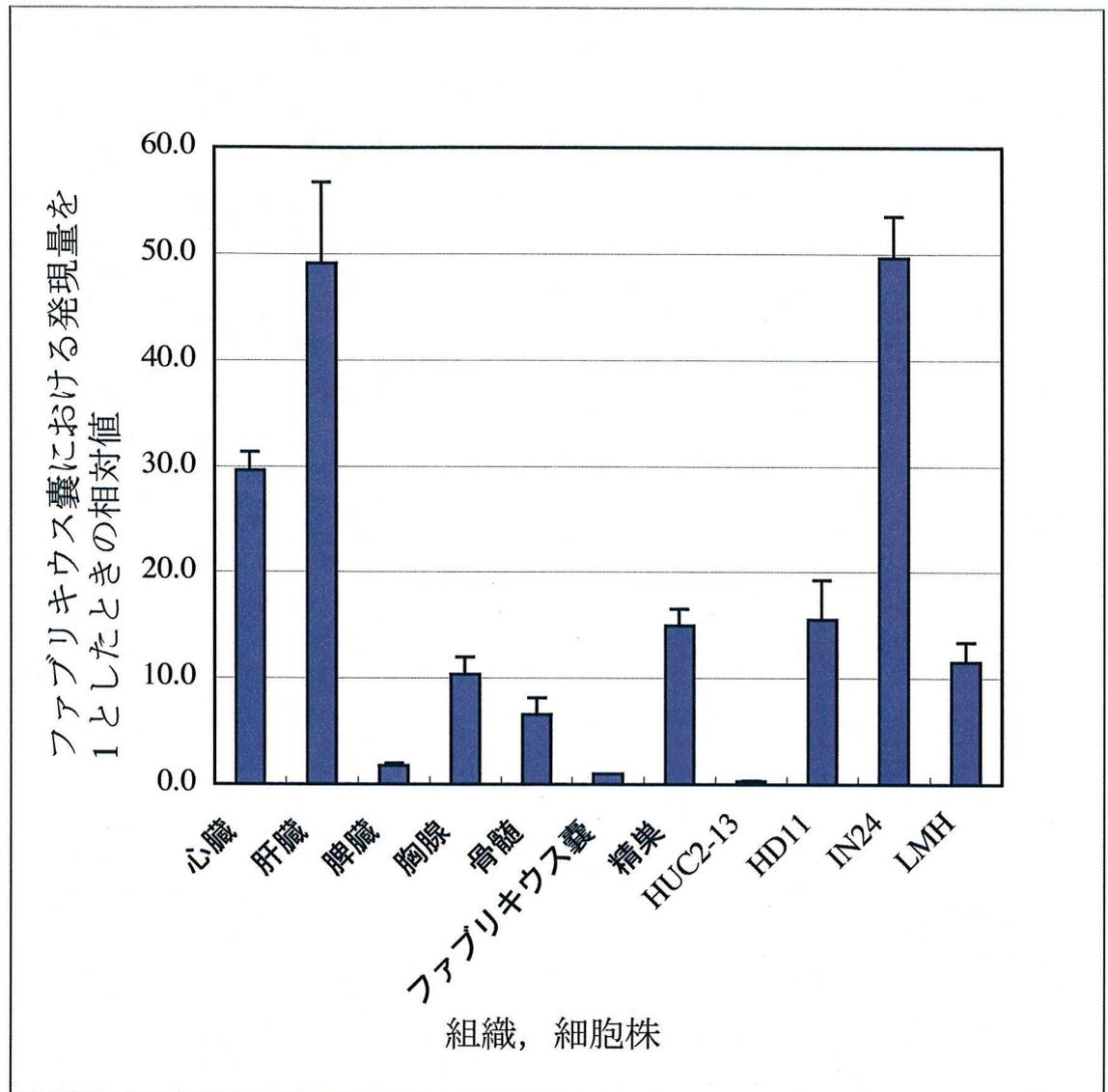


図22. ニワトリ各組織および細胞株におけるchIL-6R mRNA の定量的解析

高く (46.1), 次いで HD11 (11.3), LMH (9.4) の順に発現量が高かったが, HUC2-13 (0.2) は RT-PCR の結果と同様に発現量が低かった.

(7) HUC2-13 および LMH におけるリン酸化 STAT3 の検出

rchIL-6 刺激後の HUC2-13 および LMH 内 STAT3 およびチロシンリン酸化 STAT3 は, 抗マウス STAT3 抗体または抗マウスチロシンリン酸化 STAT3 抗体をそれぞれ用いたウエスタンブロット解析により検出した. その結果, STAT3 タンパク質の量は, 両細胞株の全ての rchIL-6 添加条件で変化していなかった (図 23, 下段パネル). 一方, チロシンリン酸化 STAT3 タンパク質の量は, HUC2-13 および LMH において rchIL-6 濃度依存的に増加していたが, LMH におけるリン酸化 STAT3 のシグナルは, rchIL-6 同濃度条件下の HUC2-13 におけるリン酸化 STAT3 のシグナルに比べて極めて強かった (図 23, 上段パネル).

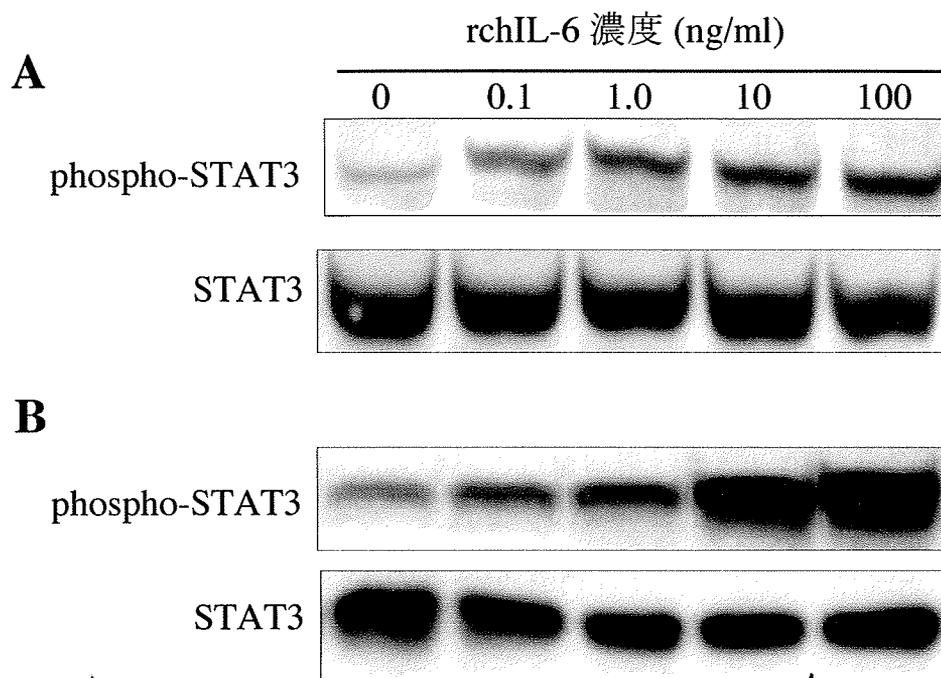


図23. rchIL-6 添加条件下のHUC2-13 およびLMH 内チロシンリン酸化STAT3 の検出

A. HUC2-13

B. LMH

3.4 考察

ヒト IL-6R は、NK 様細胞株である YT [84] から BSF2 (IL-6) に結合するタンパク質として単離された [22]. クローニングされた IL-6R は、細胞内領域に他のサイトカインレセプターに見られるチロシンキナーゼドメインを持っておらず、シグナル伝達能力のないレセプターとして注目された. この IL-6R の特徴は、IL-6 サイトカインファミリーの共通シグナル伝達レセプターである gp130 の存在をクローズアップすることとなり、結果 IL-6 の細胞内シグナル伝達機構の解明への道を拓いた. IL-6 の多機能性は、時として生体内における免疫疾患の原因となることから [15, 16, 17, 18], 最近、臨床分野においては、そのレセプターである IL-6R に対するモノクローナル抗体の作出を行って臨床面での応用が試みられる等 [19], 注目すべき点は多い. ニワトリにおいては、I 型サイトカインファミリーのリガンドのクローニングは数種類にとどまっておらず、それらのレセプターもほとんどが未解析であるのが現状であり、IL-6R も例外ではなかった. 筆者は、前章において rchIL-6 のニワトリハイブリドーマ HUC2-13 の培養時における有効性を検討し、rchIL-6 が HUC2-13 の抗体産生能をわずかではあるが向上させることを報告した. しかし、本研究のマウスハイブリドーマで得られた成績や、これまでのいくつかのマウスでの報告と照らし合わせると、現状での rchIL-6 の HUC2-13 に対する抗体産生効果は十分なものではないと考えられた. そのため、今後 rchIL-6 の有効性を更に検討していくには、その特異的レセプターである chIL-6R の解析を行うことが必要不可欠であると考えられた. そこで本研究では、3' および 5' RACE 法を用いて chIL-6R の遺伝子クローニングを試みた. RACE 法に用いるプライマーは、ニワトリの EST データベースに登録されている哺乳類 IL-6R 相同分子の部分塩基配列を元に作製し、作製したプライマーと、LMH cDNA を用いた 3' および 5' RACE により、全長 1,857 bp の chIL-6R 遺伝子の完全長クローニングに成功した.

本研究でクローニングした chIL-6R の細胞内領域は、哺乳類 IL-6R と同様にチロシンキナーゼドメインを有していなかった (図 17). 先程も述べたように、ヒト IL-6R は細胞内領域にチロシンキナーゼを持たない、つまりそれ自体ではシグナルを伝達できないレセプターであり、この特徴は他の多くのサイトカインレセプターには見られないものである. マウスでは 2 種類の IL-6R 遺伝子がクローニングされたが [85], 1 つはマウス脾臓由来 cDNA ライブラリーからクローニングされた遺伝子で、細胞内領域がヒト IL-6R と高い相同性を示す. もう 1 つは、マウスプラズマ細胞腫株 P3U1 より単離された cDNA で、レセプターの細胞内領域が intracisternal A-particle 遺伝子の long terminal repeat (IAP-LTR) の一部と置き変わっている [86]. IAP 遺伝子はマウスのゲノムに存在する非感染性のレトロウィルス様遺伝子で、ゲノム中を移

動することが知られている [87]. この変異型レセプターまたは正常型レセプターを発現させた IL-6 依存性ヒト T 細胞株 KT3 は, マウス IL-6 を添加することにより, 共に細胞増殖を誘導されたことから [85], マウス IL-6R の細胞内領域は, ヒト IL-6R と同様, IL-6 のシグナル伝達に全く関与しないことが判明した. これらの結果から, 本研究でクローニングした chIL-6R の細胞内領域は, 哺乳類 IL-6R と同様にシグナル伝達に必要なではないことを強く示唆している.

chIL-6R の塩基配列から予想されるアミノ酸は 445 アミノ酸であり, これはヒト IL-6R (468 アミノ酸), ブタ IL-6R (467 アミノ酸) および正常型マウス IL-6R (460 アミノ酸) よりも短かった. これは, 細胞外領域および膜貫通領域までは哺乳類とほぼ同等の長さであるが (図 16), 細胞内領域の長さは 59 アミノ酸であり, 哺乳類 IL-6R の細胞内領域が約 80 アミノ酸に対して約 20 アミノ酸短いことに起因している. さらに, 相同性検索の結果, この細胞内領域は, chIL-6R の全配列の中で哺乳類と最も相同性の低い部位であることがわかり (データは示さず), ニワトリ独自の配列であることが示唆された. しかし逆の見方をすれば, 先にも述べたように, IL-6R の細胞内領域は IL-6 のシグナル伝達に全く関与していないことから, 最も保存度の高い必要のない領域であるともいえる. 一方, 細胞外領域に関しては, I 型サイトカインファミリーの特徴である IG ドメイン, WSXWS モチーフ [21] を含んだ FN III ドメインが存在すること, また FN III ドメインの N 末端側に 4 つのシステイン残基が完全に保存されていることから (図 18, ▼), 本研究でクローニングした chIL-6R が I 型サイトカインレセプターファミリーの特徴を良く保存していることがうかがえた. IL-6R の IG ドメインは哺乳類において, リガンドとの結合には関与しないが, レセプタータンパク質の膜上への発現や安定性に重要であると報告されており [88], chIL-6R でも同様に重要な部位であると思われる. FN III ドメインの上流に存在する 4 つのシステイン残基は, I 型サイトカインレセプターファミリーに特徴的なアミノ酸であり [89], ニワトリでは, この 4 つの重要なシステインに加えて, 合計 9 つのシステイン残基が完全に保存されていたことから, chIL-6R が哺乳類 IL-6R と類似した立体構造を形成することが示唆された. また, chIL-6R の全配列が哺乳類 IL-6R と 40% 前後の相同性, 50% 前後の類似性を示したのに対し, chIL-6R の FN III ドメインは哺乳類 IL-6R の FN III ドメインと 50% 超の相同性および 65% 前後の類似性を示していたこと (表 15, 16 および 17), また, ヒト IL-6R の FN III ドメインのみで IL-6 と 90% 以上の結合力を有することから [90], chIL-6R においても FN III ドメインの重要性が示唆された. さらにヒト IL-6R では, 立体構造をとる過程において, β -シートの間で形成されるループ構造の内 [82], F/G ループに存在するアミノ酸 Glu²⁹⁷, Phe²⁹⁸, Gly²⁹⁹ および Gly³⁰⁰ が, IL-6 との結合に特に重要であることが報告されている [82, 83]. Gly³⁰⁰ に変異の入ったレセプターは, IL-6 との結合能が完全に

失われており [82], F/G ループのアミノ酸残基の重要性がうかがえる. グリシンはペプチドの可動性に重要なアミノ酸であることから, F/G ループに存在する 2 つのグリシン残基も, このループの可動性を担っていると想像される. 本研究でクローニングした chIL-6R の FN III ドメインには, これら 4 つのアミノ酸が全て保存されていたことから (図 18, #), ヒトと同様, ニワトリにおけるこれらのアミノ酸が, chIL-6 との結合に重要であることが示唆された.

ところで, ヒト IL-6R 遺伝子はヒトゲノムの第 1 染色体上に存在するが, オールタナティブスプライシングにより 2 種類の転写産物 (huIL-6R variant 1, huIL-6R variant 2) が存在することが報告されている [24]. variant 2 は, variant 1 とは異なるポリ A 部位を用いた結果, 膜貫通領域以降を持たない細胞外領域のみからなる可溶性タンパク質として翻訳される. 可溶性 IL-6R (soluble-formed IL-6R; sIL-6R) は, IL-1 など他の可溶性サイトカインレセプターがリガンドの作用に抑制的に機能する [91] のとは対照的に, IL-6 の作用を相乗的に高めることが知られている [92]. しかし, chIL-6R は, PCR の過程で, ORF 領域を含む形で増幅した時に, ORF よりも短い増幅断片が認められなかったこと, また chIL-6R の ORF を標識プローブとして用いた PCR/サザンブロット解析でも単一バンドのみが検出されたことから (データは示していない), ニワトリ IL-6R ではオールタナティブスプライシングは起きていないと考えられる. IL-6R は, 鳥類以下の高等動物では今回のニワトリでのクローニングが初めての報告であり, 哺乳類でのクローニング例も少ないため, 明確ではないが, 最近クローニングされたニワトリ IL-11R [93] 遺伝子にもオールタナティブスプライシングが認められなかったことも鹹味すると, この現象は鳥類独自の特徴であるとも考えられる.

本研究では, 様々なニワトリ組織および細胞株由来 cDNA を鋳型として, RT-PCR 法により chIL-6R mRNA の発現を解析した. その結果, 各組織においては, 肝臓および精巣で最も強い発現が認められ, 次いで脾臓および胸腺においても強い発現が認められた. また, 心臓, 肺, 腎臓, 骨髄およびファブリキウス嚢においても, 弱いながらも発現が認められた. 一方, 筋胃, 脾臓および卵巣では, chIL-6R mRNA は検出限界以下であった (図 19). マウス各組織における IL-6R mRNA の発現解析では, 脾臓, 胸腺および肝臓で発現が認められ, 腎臓および脳では検出限界以下であったことから [85], ニワトリ各組織における chIL-6R mRNA の発現様式は, 腎臓で弱い発現が認められた点は異なるものの, それ以外の組織に関してはマウス各組織における発現様式と類似していた. 中でも, 肝臓における強い発現は哺乳類の報告と一致している. その哺乳類では, IL-6 は肝臓または肝細胞株への急性期タンパク質の合成を促すことが知られている [11]. ニワトリにおいても, LPS 刺激したニワトリ胚線維芽細胞の培養上清中の因子が, ニワトリ肝細胞 LMH のフィブロネクチン合

成を転写および翻訳レベルで誘導し [59], この培養上清中の因子が哺乳類 IL-6 相同分子であることが示唆されていた. これらの報告と今回の結果から, 肝細胞は, ニワトリにおいても主要な chIL-6 の標的細胞の一つであることが強く示唆された. また, 哺乳類では, IL-6 は T 細胞の分化および活性化の促進や [9], B 細胞を抗体産生細胞へと分化させる機能を持つなど [3], リンパ球系細胞にも多岐に渡って作用していることが報告されている. ニワトリにおいて, 1 次リンパ組織である胸腺, ファブリキウス嚢および骨髄, 2 次リンパ組織である脾臓において chIL-6R mRNA の発現が認められたことは, chIL-6 が哺乳類 IL-6 と同様, リンパ球系細胞の分化や活性化に作用する可能性を示唆している. さらに, STAT3 ノックアウトマウスは, 胎生期の極めて初期に死亡し, 原腸形成に至らないことが報告されており [26], 初期発生段階における, IL-6 をはじめとする STAT3 を転写因子として用いるサイトカインの重要性が示唆されている. 本研究でのニワトリ精巣における chIL-6R mRNA の強い発現は, chIL-6 がニワトリの初期発生段階においても重要な役割を担っている可能性を示唆している.

続いて, ニワトリハイブリドーマ HUC2-13 における発現に特に着目して, ニワトリ各細胞株における発現を, chgp130 mRNA の発現と共に解析した. また, マウスハイブリドーマ 17H5 および 2H9 における IL-6R と gp130 mRNA の発現も同時に解析することで, マウスハイブリドーマにおける両 mRNA の発現様式と HUC2-13 での発現様式を比較した. その結果, ニワトリにおいては, chIL-6R mRNA は, マクロファージ様細胞株 HD11, 単球性白血病細胞株 IN24 および肝細胞株 LMH おいて強い発現が認められた (図 20, 上段パネル, レーン 4-6). 特に, LMH における chIL-6R mRNA の発現は, HD11 および IN24 に比べても非常に高く, 肝臓組織における高い発現と一致していた. それに対して, ニワトリハイブリドーマ HUC2-13 およびニワトリ融合用親株 MuH1, MS12A における chIL-6R mRNA の発現は低いものであった (図 20, 上段パネル, レーン 1-3). 一方, chgp130 mRNA の発現解析では, chIL-6R の場合とは逆に, MuH1, MS12A および HUC2-13 において同程度の非常に高い発現が認められ, LMH では比較的強い発現が, また HD11 および IN24 では低い発現であった (図 20, 中段パネル). HUC2-13 は, MuH1 および免疫したニワトリ脾臓細胞を用いて, 細胞融合法により樹立されたハイブリドーマであり, HUC2-13 における chIL-6R mRNA の発現レベルは, 親株である MuH1 での発現レベルと類似していたこと, また脾臓における chIL-6R mRNA 発現レベルよりも低いものであったことから, HUC2-13 の chIL-6R 発現様式は親株である MuH1 の形質を強く引き継いだものと想像される. また, 2 種類のマウスハイブリドーマにおける両遺伝子の発現様式は, HUC2-13 の発現様式と類似していたが (図 20, レーン 7, 8), gp130 mRNA の発現量に対する IL-6R mRNA の発現量 (相対値) は, HUC2-13 よりも高かった (図

21). この結果が、第二章における rchIL-6 の HUC2-13 およびマウスハイブリドーマ MH60 に対する効果の差を反映するものであれば、その要因となるのは、両ハイブリドーマにおける IL-6R 発現量の差であることが十分に考えられた。そこで、chIL-6R mRNA の発現量の差異が顕著であった HUC2-13 および LMH 細胞抽出物を用いてウエスタンブロット解析によりチロシンリン酸化 STAT3 を検出したところ、rchIL-6 同濃度条件下における LMH 内チロシンリン酸化 STAT3 タンパク質の量は、HUC2-13 に比べて劇的に増加していた。これらの結果から、HUC2-13 と、LMH や MH60 における IL-6 シグナル量の違いは、これらの細胞における IL-6R の発現量に反映されたものであることが強く示唆された。よって、rchIL-6 と共に可溶型 chIL-6R を用いることにより、リン酸化 STAT3 量の増加、つまりシグナル量の増加が引き起こされ、その結果ニワトリハイブリドーマの抗体産生能を更に上昇させることが可能になると考えられた。

ところで哺乳類では、近年、IL-6 と sIL-6R をリンカーで結合した融合タンパク質、いわゆる Hyper-IL-6 (H-IL-6) が作製され、この融合タンパクが *in vitro* および *in vivo* において有用な因子であることが報告されている [94, 95, 96, 97]。H-IL-6 は、gp130 を発現しているが IL-6R の発現量が低い、または全く発現していないような細胞に対して非常に有効であり、IL-6 と sIL-6R を同時に添加するよりも 100 から 1000 分の一の濃度で十分な効果を発揮することが報告されている [94]。これは、IL-6 と IL-6R を同時添加した場合に、培地中に拡散する恐れがあるのとは対照的に、リンカー配列を介してリガンド/レセプター複合体を迅速に形成できる利点を有するからであると考えられる。よって、ニワトリハイブリドーマの培養系においても、IL-6 と IL-6R を同時添加するよりも、ニワトリ型 H-IL-6 (H-chIL-6) を用いる方が有効であると予想された。そこで次章では、可溶型 chIL-6R のニワトリハイブリドーマ培養系への活用として H-chIL-6 タンパク質の作製を行い、chIL-6 単独添加条件との活性を比較することでその有効性を検討することにした。合わせて、chIL-6 添加時における HUC2-13 内の抗体遺伝子およびその関連遺伝子の発現を検証することで、chIL-6 添加による HUC2-13 抗体産生機構の解析を試みた。

第4章

ニワトリ IL-6 リセプターの HUC2-13 培養系への活用
並びに
IL-6 添加による HUC2-13 抗体産生機構の解析

4.1 序論

第3章では、ニワトリ IL-6 リセプター (chIL-6R) の遺伝子クローニングを行い、ニワトリの様々な組織および細胞株を用いてその発現を解析した。その結果、ニワトリ HUC2-13 では、chgp130 mRNA の発現量に対する chIL-6R mRNA の発現量は、ニワトリ肝細胞株 LMH やマウスハイブリドーマと比較して極めて低いことが判明し、HUC2-13 と比較して LMH やマウスハイブリドーマにおけるリン酸化する STAT3 の量の違いが、各細胞における IL-6R の発現量に反映されたものであることが強く示唆された。従って、rchIL-6 と共に chIL-6R を使用することにより、HUC2-13 に対して STAT3 のリン酸化をさらに誘導できるのではないかと考えられた。

近年、哺乳類において、IL-6 と sIL-6R をリンカーで結合した融合タンパク質、Hyper-IL-6 (H-IL-6) が作製されている。H-IL-6 は、gp130 を発現しているが IL-6R の発現量が低い、または全く発現していないような細胞に対して IL-6 のシグナルを伝達することが可能であり、また IL-6 と sIL-6R を同時に添加するよりも 100 から 1,000 分の一の濃度で十分なシグナルを伝達することが報告されている [94]。これは、IL-6 と IL-6R を同時添加した場合に、培地中に拡散する恐れがあるのとは対照的に、リンカーを介してリガンド/レセプター複合体を強制的に形成できる利点を有するからである。哺乳類でのこれらの知見から、ニワトリハイブリドーマの培養系においても、IL-6 と IL-6R を同時添加するよりも、ニワトリ型の H-IL-6 (H-chIL-6) を用いる方が有効であることが予想された。

ところで、哺乳類では、イムノグロブリンの合成および分泌は、抗原感作や IL-6 などのサイトカインによって促進されるが、IL-6 のシグナルは、イムノグロブリンの産生を転写レベルで制御している [68]。IL-6 による標的遺伝子の転写制御は、転写因子である C/EBP が関与している [98]。哺乳類において、C/EBP ファミリーは現在 6 種類 (α , β , γ , δ , ϵ および ζ) が報告されているが、特に成熟 B 細胞では C/EBP β および C/EBP γ が発現している [99]。C/EBP γ は、様々な組織や細胞株で発現が確認されているが、タンパクレベルでの発現は未分化 B 細胞で特に認められる [100]。また、N 末端側に C/EBP ファミリーに特徴的な転写活性ドメインを有しておらず、他の活性型 C/EBP とヘテロ二量体を形成して転写活性を阻害することが報告されている。それに対して、C/EBP β は B 細胞の分化・成熟に伴って発現量が上昇することが報告されている [99]。未熟 B 細胞が抗体産生 B 細胞へと分化していく過程は、IL-6 のシグナルや抗原感作により転写を促進する C/EBP β の発現量が増加し、転写を抑制する C/EBP γ の発現量を上回ることにより起きていると考えられる。また、小胞体内シャペロンである BiP は、小胞体内に移行した重鎖と軽鎖の正確なフォールディングに関与し、正確な抗体分子の形成を促す [101]。このように、抗体分子の合成・

分泌における機構が哺乳類では明らかになりつつある。

本章では、chIL-6R のニワトリハイブリドーマ培養系への活用として、まず HUC2-13 への組み換え chIL-6R の発現を試みた。続いて、真核細胞を用いて H-chIL-6 を作製し、HUC2-13 に対して chIL-6 または H-chIL-6 を添加して、各条件におけるリン酸化 STAT3 を検出した。合わせて、chIL-6, H-chIL-6 添加、非添加時における HUC2-13 内の抗体遺伝子およびその発現制御に関与すると考えられる遺伝子の発現を解析した。

4.2 材料と方法

(1) 供試細胞株

本章では, HUC2-13 および LMH を供試した. 各細胞株は, 第 2 章および第 3 章の材料と方法に準じて継代維持した.

(2) 組み換え chIL-6R の作製

組み換え chIL-6R の作製は, 真核細胞発現ベクターである pSeqTag2A を発現ベクターとして用いた. また, 本章で使用した全てのプライマーは, 表 18 に示した.

a. chIL-6R 遺伝子の増幅

chIL-6R 遺伝子は, KOD plus を用いた PCR 法により増幅した. 成熟型 chIL-6R をコードする領域を増幅するために, 第 3 章で決定した chIL-6R の塩基配列を元にプライマーを作製し (pSeq-IL6R-1, pSeq-IL6R-2), タンパク質発現ベクターの MCS へのライゲーションを考慮して, *Hind* III および *Xho* I の制限酵素部位を付加した. PCR 反応は, 第 3 章で合成した LMH 由来 cDNA を鋳型として, 94°C, 2 分間の加熱の後に, 94°C, 30 秒間 (熱変性), 63°C, 30 秒間 (プライマーのアニーリング) および 72°C, 2 分間 (伸長反応) を 1 サイクルとして 35 サイクル行い, 最後に 72°C, 5 分間反応させた. サーマルサイクラーは ABI 9700 を使用し, PCR 反応の組成は表 19 に示した.

b. chIL-6R 遺伝子の精製

a の PCR 反応液は, 1% アガロースゲル中で電気泳動した後, 第 2 章の材料と方法 (2)-d に準じて染色, 洗浄および切り出し精製した. 精製した遺伝子断片は, Ultrospec 2100 *pro* を用いて濃度を測定後, 使用時まで -20°C で保存した.

c. chIL-6R 遺伝子のクローニング

b で精製した遺伝子断片および発現ベクターである pSeqTag2A は, *Hind* III および *Xho* I で制限酵素処理を行った後, 1% アガロースゲル中で電気泳動し, 第 2 章の材料と方法 (2)-d に準じて染色, 洗浄および切り出し精製した. 精製後, Ligation

表18. 本章で使用したプライマー

primer	sequence	T _m (°C)
[chIL-6R 増幅用プライマー]		
pSeq-IL6R-1	5'-CGAAGCTTGGCCCGGAGCCAACGTG-3' <i>Hind</i> III	77
pSeq-IL6R-2	5'-CGCTCGAGCCTTCCCGAGAGG-3' <i>Xho</i> I	65
[H-chIL-6 作製用プライマー]		
pSeq-D2D3-F	5'-CGAAGCTTGGTGAAGAGCCCCCGAG-3' <i>Hind</i> III	72
pSeq-D2D3-L	5'-GCCCTCCCTCCACTGCCACCTCCCTCCCTCTCTGTCCAGGGGTG-3' リンカー配列	84
pSeq-IL6-L	5'-GGCAGTGGAGGCGGATCAGTAGAACCGCTGCCCGCCGCGG-3' リンカー配列	89
pSeq-IL6-R	5'-CGCTCGAGCGGCACTGAAACTCCTG-3' <i>Xho</i> I	68
[発現解析用プライマー]		
HUC2-VH-1	5'-GCTCAGCCCTCGTCTGCAAG-3'	62
HUC2-VH-2	5'-GCCCCACGTGTCGATATTATC-3'	64
HUC2-VL-1	5'-AGCCGGCCTCGGTGCAGC-3'	66
HUC2-VL-2	5'-GAGATCAGCATAACTACTGA-3'	56
SOCs3-1	5'-TAAGAGCGGATACCACTGG-3'	62
SOCs3-2	5'-TAGTGTGCCACCACTTCAG-3'	62
EBPb-1	5'-GGCTAATTCTATTACGAGG-3'	56
EBPb-2	5'-CTCCACTTTGGTCTCCACG-3'	60
EBPg-1	5'-AGAACACCGCTACAGATGCC-3'	62
EBPg-2	5'-CTTCTTGGAGCTGGGTGAC-3'	58
BiP-1	5'-GCAGGACATCAAGTATCTGC-3'	60
BiP-2	5'-CAAAAGTCTTCCACCCAGG-3'	62
GAPDH-1	5'-CCGTGTTGTGGACTTGAATGGT-3'	55
GAPDH-2	5'-TGTGTGCTTGGCTCACTCCTT-3'	55
[ゲノムPCR 用プライマー]		
IgH-DNA-1	5'-ACGGCTAACGAAAGCCGGAGCCC-3'	62
IgH-DNA-2	5'-CCTGCAGACGAGGCTGAGC-3'	66

表19. chIL-6R のPCR 反応液組成

組成	容量 (μl)
10 x KOD buffer	5.0
2.5 mM dNTPs	5.0
25 mM MgSO ₄	3.2
pSeq-IL6R-1 (25 μM)	2.0
pSeq-IL6R-2 (25 μM)	2.0
KOD plus (1 U/μl)	1.0
LMH cDNA (20 ng/μl)	2.5
DW	29.3
計	50.0

High ligation kit を用いて、ベクターとインサートのモル比が 1 対 3 になるように調製し、キット添付のプロトコルに従って chIL-6R 遺伝子と pSeqTag2A をライゲーションした。ライゲーション後の DNA は、第二章の材料と方法 (4)-b に準じて宿主大腸菌 DH5a コンピテント細胞に形質転換した。形質転換後の大腸菌は、100 µg/ml アンピシリン含 LB プレートに塗布し、37°C で 12 時間培養した。終夜培養後、出現したコロニーを無作為に爪楊枝でかきとり、コロニー PCR 法によりインサートの有無を確認した。コロニー PCR は、pSeq-F および pSeq-R をプライマーとして第二章の材料と方法 (2)-d に準じた。増幅した遺伝子断片を含む PCR 反応液は、第 3 章の材料と方法 (3)-b に準じて ExoI/SAP 処理を行い、反応液中のプライマーを完全に除去した後に、Big Dye terminator ver. 3.1 cycle sequencing kit およびシーケンス用プライマー (pSeq-F, pSeq-R) を用いたダイレクトシーケンスによりシーケンス反応した。以降の塩基配列の決定および解析までの操作は、第 2 章の材料と方法 (2)-d に準じた。

d. chIL-6R プラスミド DNA の大量調製

目的の遺伝子を有するプラスミド DNA は、第 2 章の材料と方法 (4)-c に準じて、Qiagen Endo-free Maxi kit を用いて大量調製を行い、使用時まで -20°C で保存した。

(3) ニワトリ細胞における組み換え chIL-6R の発現

ニワトリ細胞への chIL-6R プラスミド DNA の導入は、Gene pulser Xcell Electroporation system (BIO RAD) を用いたエレクトロポレーション法により行った。エレクトロポレーションの基本操作は、キット添付のプロトコルに準じた。

a. EGFP 発現ベクターを用いた至適導入条件の検討

ニワトリ細胞における組み換え chIL-6R の高効率な発現を目的として、pIRES2-EGFP (BECTON DICKINSON) ベクターを用いて、遺伝子導入の至適条件を検討した。このベクターは、MCS の 3' 下流にリボソーム認識配列 (internal ribosome entry site; IRES) および緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein; EGFP [102]) 遺伝子がコードされており、細胞導入後の遺伝子発現は、蛍光顕微鏡下において EGFP の発光を観察することにより可能である。

HUC2-13 および LMH は、遺伝子導入前日に 100 mm 培養用ディッシュ (BECTON DICKINSON) 1 枚あたり 8×10^6 細胞を播いて前培養を行った。前培養の後、細胞を

それぞれの増殖培地で 2 回遠心洗浄して、血球計算盤を用いて生細胞数を算出し、最終的に 2×10^6 細胞/ml の濃度になるように各細胞の増殖培地に再浮遊させ、60 mm 培養用ディッシュ (BECTON DICKINSON) に 5 ml ずつ播いた。エレクトロポレーションは、キット添付のプロトコルに記載された哺乳動物細胞への導入条件 (全 11 条件) に準じて行った。細胞への遺伝子導入および発現は、遺伝子導入 24 時間後に細胞を蛍光顕微鏡下で観察し、EGFP の蛍光の有無により評価した。また、合わせて、各条件における細胞へのダメージを検討するために、血球計算盤を用いて全細胞数と生細胞数を算出し、細胞生存率を算出した。

b. 組み換え chIL-6R のニワトリ細胞への発現

HUC2-13 および LMH への chIL-6R プラスミド DNA の導入は、(3)-a で得られた至適条件を用いて行った。両細胞は、遺伝子導入 24 時間後に回収して PBS で遠心洗浄後、細胞可溶化緩衝液を用いて可溶化し、同タンパク量を SDS-PAGE に供試した。両細胞における組み換え chIL-6R タンパク質の発現は、抗 *myc* 抗体 (Invitrogen) を用いたウエスタンブロット解析により検討した。なお、ウエスタンブロット解析の基本操作は、第二章の材料と方法 (3)-f に準じた。

(4) Hyper-chIL-6 (H-chIL-6) の作製

H-chIL-6 は、chIL-6R の D2D3 領域 (102-309 残基) と、成熟型 chIL-6 (48-241 残基) をコードする遺伝子をそれぞれ PCR 反応により増幅後、D2D3 増幅用の 3' プライマー (pSeq-D2D3-L) と chIL-6 増幅用の 5' プライマー (pSeq-IL6-L) に付加してあるリンカー配列部位で両遺伝子をアッセムブリー、再増幅反応を行い、真核細胞発現ベクター pSeqTag2A にクローニングして動物細胞に導入、発現させた (図 24)。

a. D2D3 および chIL-6 遺伝子の増幅

D2D3 遺伝子の増幅は、KOD plus を用いた PCR 法により行った。chIL-6R の D2D3 をコードする領域を増幅するために、第 3 章で決定した chIL-6R の塩基配列を元にプライマー (pSeq-D2D3-F, pSeq-D2D3-L) を作製した。PCR 反応は、本章で作製した chIL-6R プラスミド DNA を鋳型として、94°C、2 分間の加熱の後に、94°C、30 秒間 (熱変性)、63°C、30 秒間 (プライマーのアニーリング) および 72°C、2 分間 (伸長反応) を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、最後に 72°C、5 分間反応させた。なお、サーマルサイクラーは ABI 9700 を使用し、PCR 反応の組成は表 20 に示した。

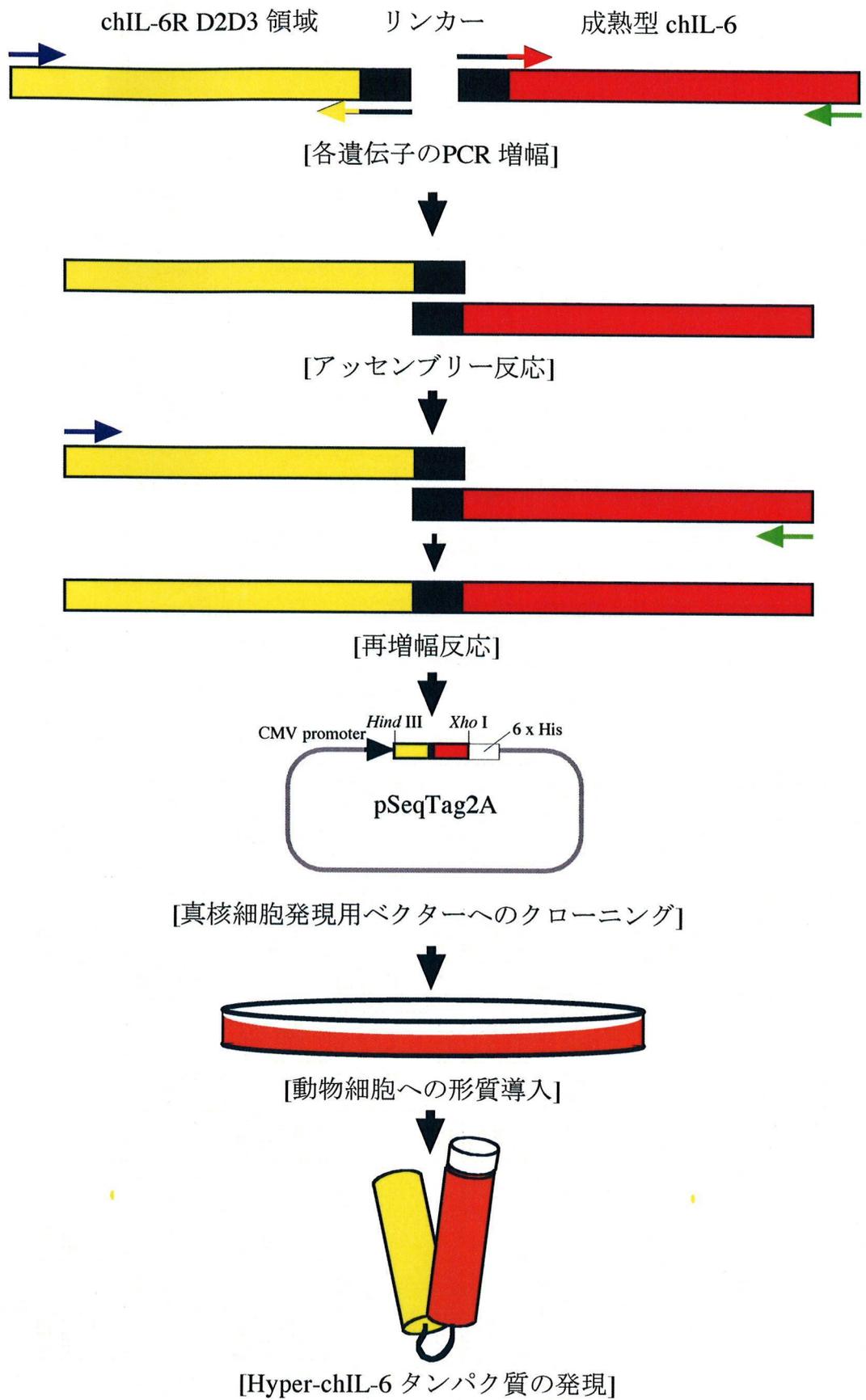


図24. Hyper-chIL-6 作製の模式図

表20. chIL-6R D2D3 領域のPCR 反応液組成

組成	容量 (μ l)
10 x KOD buffer	5.0
2.5 mM dNTPs	5.0
25 mM MgSO ₄	3.2
pSeq-D2D3-F (25 μ M)	1.0
pSeq-D2D3-Le (25 μ M)	1.0
KOD plus (1 U/ μ l)	1.0
chIL-6R plasmid DNA (10 ng/ μ l)	5.0
DW	28.8
計	50.0

続いて、chIL-6 遺伝子は、D2D3 と同様に KOD plus を用いた PCR 法により増幅した。第 2 章の材料と方法 (2)-c と同様に、成熟型 chIL-6 をコードする領域を増幅するために、chIL-6 の塩基配列を元にプライマー (pSeq-IL6-L, pSeq-IL6-R) を作製した。PCR 反応は、本章の材料と方法 (2)-d で作製した chIL-6 プラスミド DNA を鋳型として、D2D3 遺伝子の増幅条件と同一の条件で行った。なお、サーマルサイクラーは ABI 9700 を使用し、PCR 反応の組成は表 21 に示した。

b. アッセンブリー・再増幅反応

a の各 PCR 反応液は、1.5% アガロースゲル中で電気泳動後、第 2 章の材料と方法 (2)-d に準じて染色、洗浄および切り出し精製を行った。精製各遺伝子断片の濃度は Ultraspec 2100 pro を用いて測定し、モル濃度を算出した。

アッセンブリー反応は、同モル量の各精製遺伝子断片と KOD plus を用い、94°C、2 分間の加熱の後に、94°C、15 秒間 (熱変性) および 50°C、1 分間 (プライマーのリンカー部位のアニーリング) を 1 サイクルとして 7 サイクル行い、最後に 68°C、1 分間反応させることで行った。なお、サーマルサイクラーは ABI 9700 を使用し、アッセンブリー反応の組成は表 22 に示した。また、この反応系に供試した各遺伝子断片のモル量は、0.25 pmol とした。

続いて、再増幅反応は、KOD plus を用いた PCR 法により行った。PCR 反応はアッセンブリー反応物を鋳型として、pSeq-D2D3-F および pSeq-IL6-R をプライマーに用いて 94°C、2 分間の加熱の後に、94°C、15 秒間 (熱変性)、65°C、30 秒間 (プライマーのアニーリング) および 68°C、2 分間を 1 サイクルとして 30 サイクル行い、最後に 68°C、2 分間反応させた。なお、サーマルサイクラーは ABI 9700 を使用し、PCR 反応の組成は表 23 に示した。

c. H-chIL-6 遺伝子の制限酵素処理および精製

b の PCR 産物は、1% アガロースゲル中で電気泳動後、第 2 章の材料と方法 (2)-d に準じて染色、洗浄および切り出し精製を行い、精製遺伝子の濃度は Ultraspec 2100 pro を用いて測定した。精製後、遺伝子断片は *Hind* III および *Xho* I を用いて制限酵素処理を行った。制限酵素処理後のサンプルは、上記に準じて精製を行い、Ultraspec 2100 pro を用いて濃度を測定した。精製サンプルは、使用時まで -20°C で保存した。

d. H-chIL-6 遺伝子のクローニング

表21. chIL-6 のPCR 反応液組成

組成	容量 (μ l)
10 x KOD buffer	5.0
2.5 mM dNTPs	5.0
25 mM MgSO ₄	3.2
pSeq-IL6-Le (25 μ M)	1.0
pSeq-IL6-R (25 μ M)	1.0
KOD plus (1 U/ μ l)	1.0
chIL-6 plasmid DNA (10 ng/ μ l)	5.0
DW	28.8
計	50.0

表22. アッセンブリー反応の反応液組成

組成	容量 (μl)
10 x KOD buffer	5.0
2.5 mM dNTPs	5.0
25 mM MgSO ₄	3.2
chIL-6R D2D3 (0.054 pmol/μl)	4.63 (0.25 pmol)
chIL-6 (0.115 pmol/μl)	2.17 (0.25 pmol)
KOD plus (1 U/μl)	1.0
DW	29.0
計	50.0

表23. 再増幅反応の反応液組成

組成	容量 (μl)
10 x KOD buffer	5.0
2.5 mM dNTPs	5.0
25 mM MgSO ₄	3.2
pSeq-D2D3-F (25 μM)	2.0
pSeq-IL6-R (25 μM)	2.0
KOD plus (1 U/μl)	1.0
アッセンブリー反応液	50.0
DW	31.8
計	100.0

c で精製した遺伝子断片と本章の材料と方法 (2)-c で調製した pSeqTag2A は、Ligation High ligation kit を用いて、ベクターとインサートのモル比が 1 対 3 になるように調製し、キット添付のプロトコルに従ってライゲーションした。ライゲーション後のプラスミド DNA は、本章の材料と方法 (2)-c に準じて DH5a コンピテント細胞に形質転換し、形質転換後の大腸菌は、100 µg/ml アンピシリン含 LB プレート上で 12 時間培養した。培養後に出現した大腸菌コロニー中のインサート DNA の有無は、Ex taq を用いたコロニーPCR 法により確認した。PCR 反応は、pSeq-F および pSec-R のプライマーセットを使用し、第二章の材料と方法 (2)-d に準じた。反応終了後の PCR 反応液は、1% アガロースゲル中で電気泳動後、EtBr 染色を行って紫外光下においてバンドを検出した。目的のバンドが検出できた PCR 反応液は、第 3 章の材料と方法 (3)-b に準じて ExoI/SAP 処理を行って反応液中のプライマーを完全に除去した後に、Big Dye terminator ver. 3.1 cycle sequencing kit およびシーケンス用プライマー (pSeq-F, pSeq-R) を用いたダイレクトシーケンスによりシーケンス反応を行った。以降の塩基配列の決定および解析までの操作は、第 2 章の材料と方法 (2)-d に準じて行った。

e. H-chIL-6 プラスミド DNA の大量調製

H-chIL-6 プラスミド DNA は、第 2 章の材料と方法 (4)-c に準じて、Qiagen Endo-free Maxi kit を用いて大量調製し、濃度測定後、使用時まで-20°Cで保存した。

f. H-chIL-6 プラスミド DNA の真核細胞への導入および発現

e で調製した H-chIL-6 プラスミド DNA は、第 2 章の材料と方法 (4)-d に準じて、Transfectin Lipid Reagent を用いて COS-7 または CHO-K1 に導入した。H-chIL-6 タンパク質の発現は、導入 48 時間後に培養上清を回収し、本研究で樹立した抗 chIL-6 モノクローナル抗体 E3 を用いたウエスタンブロット解析により検出した。なお、ウエスタンブロット解析の基本操作および検出は、本章の材料と方法 (3)-f に準じた。

g. H-chIL-6 の精製と定量

H-chIL-6 の精製は、第 2 章の材料と方法 (4)-e に準じた。また精製タンパク質は、原核型 rchIL-6 を標準試料としたウエスタンブロット解析により定量した。H-chIL-6 の溶出分画は、Centricon Plus-20 (MW; 30,000) (MILLIPORE) を用いて 20 倍に遠心濃

縮した。濃縮後の H-chIL-6 と 1-20 $\mu\text{g/ml}$ の標準試料は、SDS-PAGE に供試した後、本研究で樹立した抗 chIL-6 モノクローナル抗体 E3 を用いてバンドを検出した。検出したバンドは LAS 3000 内の Image Gauge ver 4.0 を用いて定量し、標準試料から作成した検量線を用いて H-chIL-6 の濃度を算出した。なお、ウエスタンブロット解析の基本操作は、第二章の材料と方法 (3)-f に準じた。

(5) chIL-6 または H-chIL-6 添加条件下の HUC2-13 内チロシンリン酸化 STAT3
およびセリンリン酸化 MEK1/2 の検出

本章の (4) で調製した CHO-K1 培養上清由来 H-chIL-6 および第 2 章の (4) で調製した CHO-K1 培養上清由来真核型 rchIL-6 (以降、それぞれ H-chIL-6 および chIL-6 と示す) は、それぞれ HUC2-13 に対して 5 pM-5 nM (H-chIL-6; 0.2-200 ng/ml, chIL-6; 0.1-100 ng/ml) になるように添加して 15 分間刺激培養後、細胞可溶化緩衝液を用いて、4°C で終夜細胞を可溶化した。以降の目的タンパク質の検出までの操作は、第 2 章の材料と方法 (5)-b に準じた。

(6) chIL-6 または H-chIL-6 添加条件下の HUC2-13 における各遺伝子の発現解析と
抗体タンパク質の検出

c. chIL-6 または H-chIL-6 添加 HUC2-13 からの全 RNA の抽出

HUC2-13 は、5 nM の chIL-6 (100 ng/ml) または H-chIL-6 (200 ng/ml) 添加、非添加条件下で 2, 4, 8, 12 および 24 時間培養後、全 RNA を抽出した。各培養条件における HUC2-13 からの全 RNA は、TRIzol 試薬を用いて、キット添付のプロトコルに従って抽出した。

b. 逆転写反応による cDNA の合成

逆転写反応による cDNA の合成は、b で抽出した全 RNA 2 μg および SuperScript III Reverse Transcriptase を用いて、第 2 章の材料と方法 (2)-b に準じて行った。

c. HUC2-13 抗体遺伝子および IL-6 関連遺伝子の発現解析

各条件下の HUC2-13 内の遺伝子の発現は、LA-Taq を用いた RT-PCR 法により解析した。PCR 反応は、b で合成した HUC2-13 由来 cDNA 100 ng を鋳型として、

HUC2-13 モノクローナル抗体の重鎖 (以下 VH と示す), 軽鎖 (以下 VL と示す), SOCS3 (NCBI under accession number AF424806), C/EBP β (NF-IL6, NF-M) [103] (NCBI under accession number NM205253), C/EBP γ (Ig-EBP) [104] (NCBI under accession number XM414137) および BiP [105] (NCBI under accession number M27260) の塩基配列を元に作製したプライマーを用いて, 94°C, 3 分間の加熱の後に, 94°C, 30 秒間 (熱変性), 58 (VH および VL) または 55°C (SOCS3, C/EBP β , C/EBP γ および BiP), 30 秒間 (プライマーのアニーリング) および 72°C, 1 分間 (伸長反応) を 1 サイクルとして 28 (VH および VL)/30 (SOCS3, C/EBP β , C/EBP γ および BiP) サイクル行い, 最後に 72°C, 7 分間反応させた. また, 内部標準遺伝子としてニワトリグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 [106] (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH, NCBI under accession number NM204305) も同様にプライマーを作製し, RT-PCR により増幅した. PCR 条件は, 94°C, 3 分間の加熱の後に, 94°C, 30 秒間 (熱変性), 60°C, 30 秒間 (プライマーのアニーリング) および 72°C, 1 分間 (伸長反応) を 1 サイクルとして 28 サイクル行い, 最後に 72°C, 7 分間反応させた. なお, サーマルサイクラーは ABI 9700 を使用し, PCR の反応組成は表 24 に示した.

増幅した GAPDH 遺伝子断片を含む PCR 反応液は, 1% アガロースゲル中で電気泳動した後, ゲルを 1 μ g/ml EtBr 含 TAE 緩衝液中で 30 分間染色し, その後 TAE 中で 10 分間洗浄した. 各反応液中の GAPDH 遺伝子増幅断片は, 第 3 章の材料と方法 (4) に準じて定量し, GAPDH 遺伝子の定量結果を元に, VH, VL, SOCS3, C/EBP β , C/EBP γ または BiP 遺伝子断片を含む PCR 反応液の泳動量を決定した. 各遺伝子断片を含む PCR 反応液は, 決定した泳動量を泳動後, 上記と同様に染色および洗浄操作を経て, LAS-3000 を用いてバンドを検出した.

d. HUC2-13 産生抗体タンパク質の検出

HUC2-13 産生抗体タンパク質は, 同モル濃度の chIL-6 または H-chIL-6 添加, 非添加培養条件の培養上清を用いてウエスタンブロット解析により検出した. HUC2-13 は, a と同条件で培養した後に, 細胞を回収して遠心により上清と細胞に分離した. 回収した各培養上清中の抗体タンパク質の検出は, 非還元状態で SDS-PAGE に供試した後に, HRPO 標識ヤギ抗ニワトリ IgG (H+L) 抗体 (Kirkegaard and Perry Laboratories) を用いて行った. また, 同条件で培養した HUC2-13 由来細胞溶解液を用いて, チロシンリン酸化 STAT3 を検出した. なお, ウエスタンブロット解析の基本操作は, 第二章の材料と方法 (3)-f に準じた.

表24. HUC2-13 各遺伝子の発現解析におけるPCR 反応液組成

組成	容量 (μ l)
10 x LA buffer	2.5
2.5 mM dNTPs	2.5
25 mM MgCl ₂	1.5
5' primer (25 μ M)	1.0
3' primer (25 μ M)	1.0
HUC2-13 cDNA (50 ng/ μ l)	2.0
LA Taq (5 U/ μ l)	0.25
DW	14.25
計	25.0

(8) Electro mobility shift assays (EMSA) 試験

a. HUC2-13 からのゲノム抽出

HUC2-13 は、 2×10^8 細胞を 50 ml チューブに回収して PBS で 2 回遠心洗浄後、可溶化緩衝液 [(10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM EDTA (pH 8.0)] 10 ml を添加して細胞を可溶化した。可溶化液には、SDS の終濃度が 1% になるように添加し、転倒混和した。その後 Proteinase K (PK) の終濃度が 100 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、転倒混和した後に 37°C で静置して終夜酵素反応を行った。なお、PK は失活しやすい酵素であるため、新たな酵素をさらに数回添加した。翌日、450 μl の 5 M NaCl と、RNase A の終濃度が 100 $\mu\text{g/ml}$ となるように加えて転倒混和した後に、37°C で 1 時間反応した。反応後、フェノールを 10 ml 加えて室温で 1 時間転倒混和し、その後 7,000 rpm で 10 分間遠心してフェノール層と水層に分離し、水層を注意深く新しい 50 ml チューブに移した (フェノール抽出)。フェノール抽出は、この後さらに 2 回行った。フェノール抽出の後、フェノール/クロロホルム抽出およびクロロホルム抽出を上記と同様の操作でそれぞれ 2 回ずつ行った。最後のクロロホルム抽出の後に回収した水層には、2.5 倍量 (25 ml) のエタノールを加えて転倒混和し、DNA を凝集させた。凝集した DNA は、滅菌爪楊枝で絡めとり、そのまま 70% エタノールに攪拌して洗浄した。洗浄後の DNA は、再び滅菌爪楊枝で絡めとり、風乾させた後に TE 緩衝液に滅菌爪楊枝ごとつけて 4°C で終夜溶解させた。翌日、TE 緩衝液に溶解した DNA 濃度を測定し、使用時まで 4°C で保存した。

b. HUC2-13 VH, SOCS3 および C/EBP β の転写開始点上流領域の塩基配列の決定

HUC2-13 VH 遺伝子の転写開始点上流領域は、a で抽出したゲノム DNA を鋳型としたゲノム PCR により増幅した。PCR 反応は、報告されているニワトリイムノグロブリン重鎖遺伝子 [107] (NCBI under accession number M30319) の転写開始点上流のゲノム配列を元に作製したセンスプライマー (VH-DNA-1) と、HUC2-13 の塩基配列を元に作製したアンチセンスプライマー (HUC2-DNA-2) を用い、94°C, 3 分間の加熱の後、94°C, 30 秒間 (熱変性), 58°C, 30 秒間 (プライマーのアニーリング) および 72°C, 1 分間 (伸長反応) を 1 サイクルとして 30 サイクル行い、最後に 72°C で 7 分間反応させた。なお、サーマルサイクラーは ABI 9700 を使用し、PCR の反応組成は表 25 に示した。増幅した遺伝子断片は、第二章の材料と方法 (2)-d に準じて切り出し精製した後に、第二章の材料と方法 (4)-b に準じて、ダイレクトシーケンスより塩基配列を決定した。なお、SOCS3 および C/EBP β 遺伝子の転写開始点上流

表25. ゲノムPCR の反応液組成

組成	容量 (μ l)
10 x LA buffer	5.0
2.5 mM dNTPs	5.0
25 mM MgCl ₂	3.0
VH-DNA-1 (25 μ M)	2.0
HUC2-DNA-2 (25 μ M)	2.0
HUC2 genomic DNA (200 ng/ μ l)	1.0
LA Taq (5 U/ μ l)	0.5
DW	31.5
計	50.0

領域の塩基配列は、NCBI Chicken Genome Resources 内の Blast the Chicken Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/GgaBlast.html>) を利用して、SOCS3 および C/EBP β mRNA の塩基配列と、ニワトリゲノムとの相同性検索により決定した。

c. VH, SOCS3 および C/EBP β 遺伝子上の転写因子結合配列の検索

b で決定した各遺伝子の転写開始点上流領域に存在する転写因子結合配列は、MOTIF: Searching Protein and Nucleic Acid Sequence Motifs (<http://motif.genome.jp/>) を用いて検索した (なお、得られた配列の信頼値 (score) は、Heinemeyer ら [108] の報告に基づいて算出されている.)。

d. 核抽出物の調整

HUC2-13 は 2×10^6 細胞で 100 mm ディッシュに播き、一昼夜前培養を行った。前培養後、HUC2-13 に対して chIL-6 を 100 ng/ml で、H-chIL-6 を 200 ng/ml の濃度になるように添加して 15 分間または 12 時間刺激もしくは無刺激で培養した。培養後、細胞は全て回収して冷 PBS で 2 回遠心洗浄後、1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF 含 PBS で 1 回遠心洗浄した。続いて、細胞は hypotonic 緩衝液 [20 mM HEPES (pH 7.9), 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Na₄P₂O₇, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF および protease inhibitor tablet] を用いて洗浄し、洗浄後の細胞は 0.2% Nonidet-P 40 (NP 40) 含 hypotonic buffer 300 μ l に懸濁してエッペンチューブに移し、4°C, 16,000 x g で 20 秒間遠心した。遠心後、上清を除いた後のペレットには、high-salt 緩衝液 (420 mM NaCl, 20% glycerol, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Na₄P₂O₇, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF および protease inhibitor tablet) を 60 μ l 加えて十分にペレットを攪拌した。攪拌後のチューブは、4°C で 30 分間緩やかに浸透した後に、4°C, 16,000 x g で 20 分間遠心して上清を回収した。回収した上清 (核抽出液) 中のタンパク濃度は、Protein Assay kit (BIO RAD) を用い、キット添付のプロトコルに従って測定した。濃度測定後の核抽出物は、使用時まで -70°C で保存した。

e. ジゴキシゲニン (digoxigenin; DIG) 標識プローブの調整

EMSA 試験に用いる各プローブの作製は、c で決定した VH, SOCS3 および C/EBP β 各遺伝子の転写因子結合配列を含む、20 塩基のセンスおよびアンチセンスプライマーをアニーリングさせることにより行った。プライマーのアニーリングは、センス

プライマーとアンチセンスプライマーを同モル混合後、20 倍濃度のアニーリング緩衝液 [0.2 M Tris-HCl (pH 8.0), 40 mM MgCl₂, 1 M NaCl, 20 mM EDTA] を終濃度が 1 倍濃度になるように添加し、98°C、5 分間の加熱の後に徐々に反応温度を低下させ、最終的に室温に戻すことを行った。続いてプローブは、20% アクリルアミドゲルにアプライし、1 x トリスホウ酸 EDTA (Tris-borate EDTA; TBE) 緩衝液中で、200V の定圧条件下で 50 分間電気泳動を行った。泳動終了後、EtBr 染色を行ってゲルを切り出した後に、400 µl の DNA 溶出用緩衝液 [0.5 M NH₄OAc, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 10 mM (CH₃COO)₂Mg] に切り出したゲルを浸して 37°C で終夜溶出させた。翌日、常法を用いて溶出したプローブの精製を行い、濃度測定を行った後に使用時まで -20°C で保存した。最後に精製プローブは、DIG Oligonucleotide Tailing Kit (Roche) を用いて、DIG 標識した。DIG 標識はキット添付のプロトコルに従って行った。なお、作製した各プローブの塩基配列は表 26 に、20% アクリルアミドゲルの組成は表 27 に示した。

f. EMSA 試験およびスーパーシフトアッセイ

d で調整した核抽出物 (0.1, 0.5 および 1.0 µg) および e で調整した DIG 標識プローブ (5 ng) は、5 倍濃度の結合緩衝液 [10 mM HEPES (pH 7.9), 0.75 mM EDTA, 40% glycerol, 0.1% NP 40, 1 µg poly (dI-dC), 1 mM DTT, 0.06% BPB, 10 mg BSA] の終濃度が 1 倍濃度となるように混合して、室温で 20 分間静置して核抽出液中のタンパク質と DNA を結合させた。タンパク質、DNA 結合後のサンプルは、8% アクリルアミドゲルにアプライし、0.25 x TBE 緩衝液中で、200V の定圧条件下で 90 分間電気泳動を行った。なお、8% アクリルアミドゲルの組成は表 28 に示した。また、電気泳動の間、転写膜である Hybond N⁺ (Amersham Biosciences) を 2 倍濃度の SSC 緩衝液中で緩やかに浸透して洗浄した。泳動終了後のゲルは、2 倍濃度の SSC 緩衝液で軽く洗浄し、VacuGene XL Blotting Unit (Amersham Biosciences) を用いて、キット添付のプロトコルに従って Hybond N⁺ に転写した。転写後のメンブレンは、UVC 500 (Hofer) を用いて、70,000 J/cm² で約 30 秒間 UV クロスリンクを行った。UV クロスリンクを行った後のメンブレンは、洗浄液に浸して室温で 5 分間洗浄後、ブロッキング液に移して室温で 30 分間浸透してブロッキングした。ブロッキング終了後のメンブレンは、ブロッキング液で 4,000 倍希釈した HRPO 標識抗 DIG 抗体 (Roche) に浸して、室温で 30 分間抗体反応を行った。抗体反応後、メンブレンは洗浄液に浸して室温で 15 分間、2 回洗浄し、最後に、第二章の材料と方法 (3)-f に準じてバンドを検出した。なお、本章で使用した洗浄液およびブロッキング液は、DIG Wash and Block Buffer Set (Roche) を使用した。

表26. EMSA 試験に用いたプローブの塩基配列

プローブ	配列 (センスストランドを示す)
C/EBP β	5'-ACTCTCT TTTCAGGAAT GCCT-3' STATx binding site
SOCS3	5'-GCGCAT TTCCAGGAAGA ACC-3' STATx binding site
HUC2-13-VH	5'-CCCTCCT TATGCAAATT AGC-3' C/EBPx binding site

表27. 20% アクリルアミドゲルの組成

組成	容量
30% acrylamide/bis-acrylamide	6.7 ml (final 20%)
DW	2.25 ml
10 x TBE	1.0 ml (final 1 x)
10% APS	100.0 μ l
TEMED	10.0 μ l
計	10.0 ml

表28. 8% アクリルアミドゲルの組成

組成	容量
30% acrylamide/bis-acrylamide	2.67 ml (final 8%)
DW	7.03 ml
10 x TBE	0.25 ml (final 0.25 x)
10% APS	40.0 μ l
TEMED	100.0 μ l
計	10.0 ml

スーパーシフトアッセイは、核抽出物とウサギ抗マウス STAT3, ウサギ抗ヒトリン酸化C/EBP β (Cell Signalling) またはウサギ抗マウス IgG (H+L) (Pepro Tech) 抗体 1.5 μ g を混和して 4°C で 1 時間反応させた後に、DIG 標識プローブと混合したものを泳動サンプルとして供試し、以降の検出までの操作は上記の方法に準じて行った。また、競合試験は、DIG 標識プローブの 1 または 10 倍量 (モル数) の非標識プローブを核抽出物および結合緩衝液と混和して室温で 5 分間反応させた後、DIG 標識プローブを反応液中に添加したものを泳動サンプルとして供試した。

(9) chIL-6 継続添加による HUC2-13 抗体産生への影響

HUC2-13 は、 1×10^6 細胞になるように 35 mm ディッシュに播いて終夜前培養を行った。前培養終了後の細胞には、培養 1 日毎に chIL-6 の終濃度が 100 ng/ml となるように添加して 4 日間培養した。培養 1 日毎の培養上清中の HUC2-13 抗体の検出は、本章の材料と方法 (6)-d に準じた。なお、対照として、chIL-6 非添加条件で培養したものと、培養初日のみに chIL-6 を上記と同濃度で添加してその後 4 日間培養したものを準備し、同様に培養上清中の HUC2-13 抗体を検出した。

4.3. 成績

(1) ニワトリ細胞への chIL-6R の発現

a. EGFP 発現ベクターを用いた HUC2-13 至適導入条件の検討

Gene pulser Xcell Electroporation system 添付のマニュアルに記載されている 11 種類の条件を用いて HUC2-13 に pIRES-EGFP 発現ベクターを形質導入した。その結果、コントロール (遺伝子非導入条件) を除いた全 11 条件で EGFP の発現を示す緑色蛍光が認められた (図 25)。至適導入条件の決定は、房木 [109] の報告に基づいて生細胞率 50% 前後の条件を採用することにした。各条件における生細胞率は、トリパンブルー染色液を用いて導入 24 時間後に算出した。その結果、各条件下における生細胞率は全て 30-70% の範囲に収束しており、No. 6, 7 および 11 は生細胞率が 50% を超えていた (図 26)。中でも No. 6 はその後の細胞増殖も良好であったことから (データは示していない)、No. 6 を至適導入条件と決定した。

d. HUC2-13 における chIL-6R の発現

a で決定した導入条件を用いて chIL-6R 発現ベクターを HUC2-13 に形質導入し、導入 24 時間後の細胞抽出液を用いて chIL-6R の発現をウエスタンブロット解析により検討した。また、対照として、HUC2-13 と同様に決定した至適導入条件を用いて、LMH に形質導入して同様に発現を検討した。その結果、LMH では遺伝子導入条件のみで約 70 kDa 付近に強いバンドと弱いバンドが 1 本ずつ検出され (図 27, レーン 4)、目的のタンパク質が発現していることがわかった。一方 HUC2-13 では、いずれの条件でも chIL-6R を示すバンドは検出されなかった (図 27, レーン 2)。また、第二章で作製した chIL-6 発現ベクターを同様に導入したところ、導入 24 時間後の LMH の培養上清から目的のタンパク質は検出されたが、HUC2-13 の培養上清からは検出されなかった (データは示していない)。

(2) H-chIL-6 の作製

a. H-chIL-6 遺伝子のクローニング

はじめに、chIL-6R の D2D3 領域と、成熟型 chIL-6 をコードする領域をそれぞれ PCR により増幅した結果、それぞれ 651 bp および 618 bp の単一バンドを得た (図

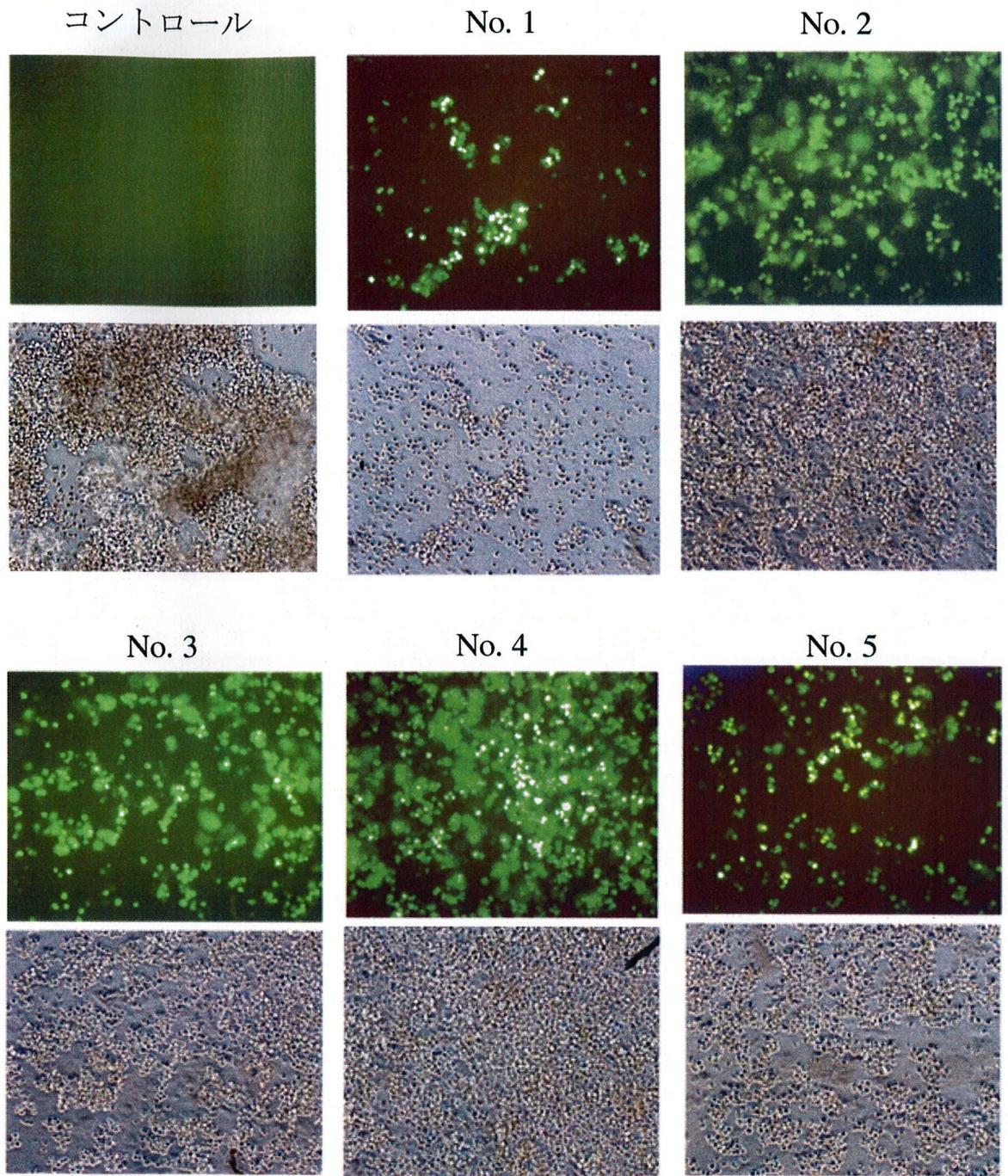


図25. エレクトロポレーション法によるHUC2-13 へのEGFP 発現ベクターの導入 (その1)

上段 ; 暗視野
下段 ; 明視野

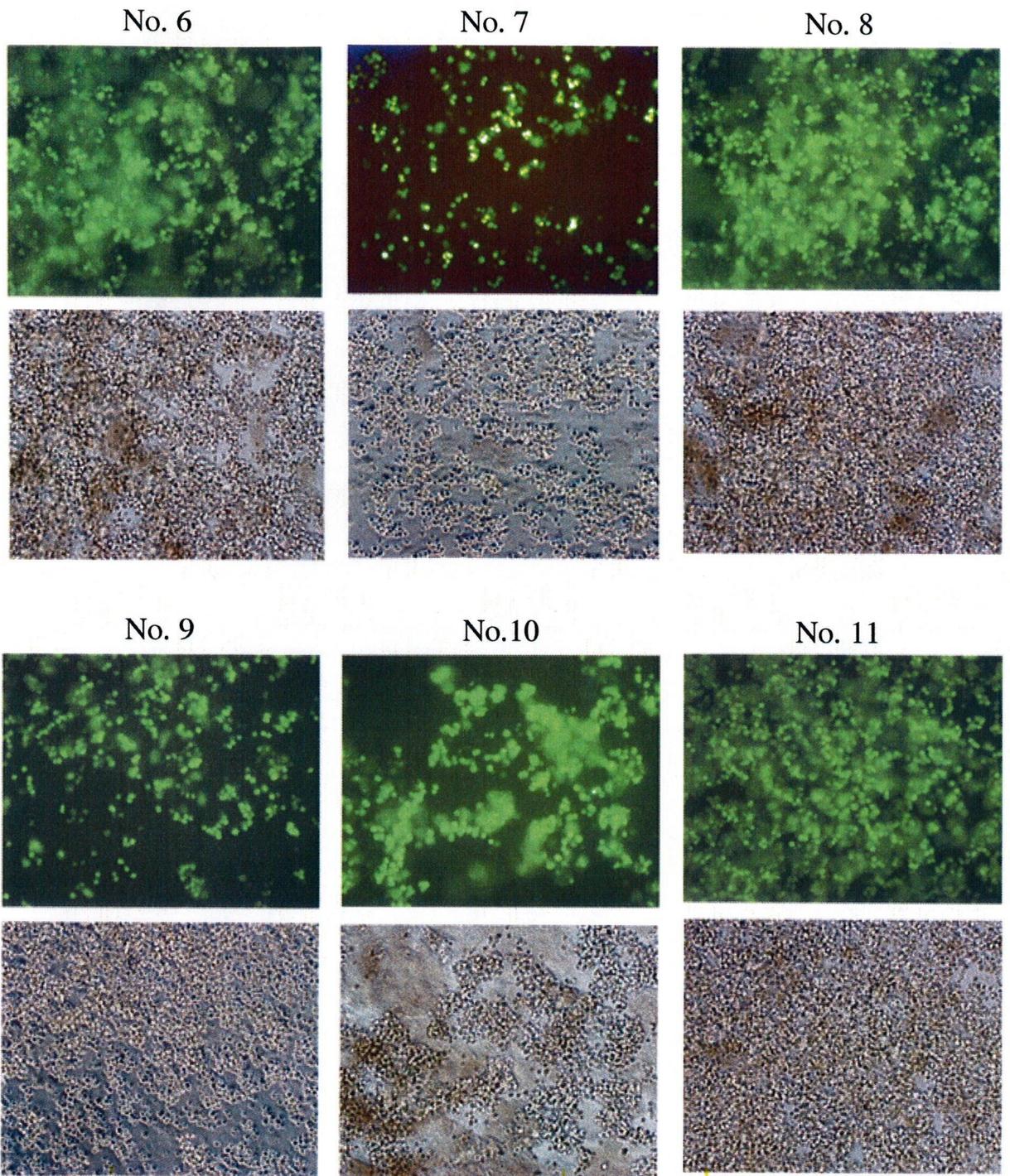


図25. エレクトロポレーション法によるHUC2-13 へのEGFP 発現ベクターの導入 (その2)

上段 ; 暗視野
下段 ; 明視野

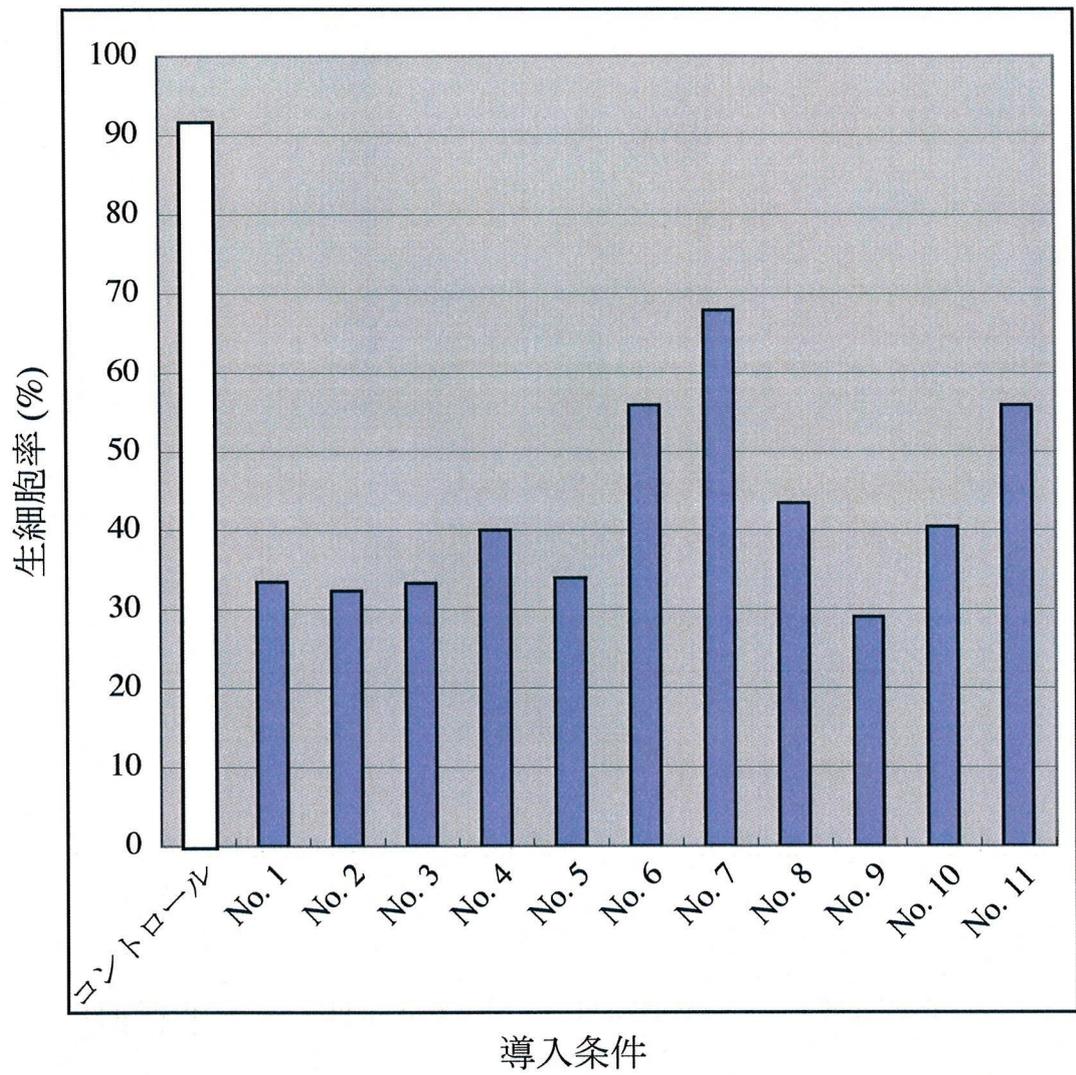


図26. 各エレクトロポレーション遺伝子導入時における細胞生存率

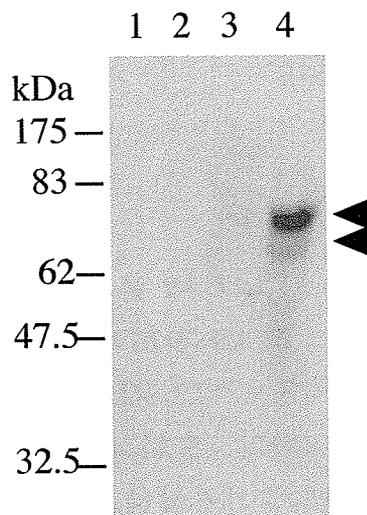


図27. HUC2-13 およびLMH における組み換え型chIL-6R の検出

- レーン1 ; chIL-6R 発現ベクター非導入HUC2-13 細胞溶解液
- レーン2 ; chIL-6R 発現ベクター導入HUC2-13 細胞溶解液
- レーン3 ; chIL-6R 発現ベクター非導入LMH 細胞溶解液
- レーン4 ; chIL-6R 発現ベクター導入LMH 細胞溶解液

◀; chIL-6R

28, レーン 1, 2). 続いて, 各遺伝子断片をアッセンブリー反応により連結し, この反応液を鋳型として再増幅反応を行ったところ, 約 1.2 kbp の位置に強いシグナルのバンドが検出された (図 28, レーン 3). このバンドは切り出し精製をして, 1.2 kbp の単一バンドを得た (図 28, レーン 4). 精製した再増幅断片は, ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定したところ, 図 29 に示すように, 1,245 bp の長さで, chIL-6R の D2D3 領域 (1-624 塩基) と成熟型 chIL-6 (664-1245 塩基) の間に, リンカー配列 (625-663 塩基) が正確に組み込まれた配列であることがわかり, 目的の融合タンパク質をコードする遺伝子を得ることができた.

(3) H-chIL-6 の作製

a. H-chIL-6 の発現

H-chIL-6 の発現は, 遺伝子導入後 24 および 48 時間後の CHO-K1 の培養上清を用いて, 抗 chIL-6 モノクローナル抗体 E3 によるウエスタンブロット解析により検討した. その結果, 分子量約 65 kDa のバンドが培養 24 時間後から上清中に認められ, 培養 48 時間後の培養上清中にはさらに強いシグナルが認められたことから (図 30), H-chIL-6 が発現し, 上清中に分泌されていることがわかった. また, COS-7 を用いて同様に遺伝子導入を行ったところ, CHO-K1 由来培養上清中に検出された同分子量のバンドが, 培養 24 時間後から検出された (データは示していない).

b. H-chIL-6 の精製および定量

H-chIL-6 は, 第二章の真核型 rchIL-6 と同様, 6 x His とニッケルレジンの親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製した. 精製後の溶出分画は, 1 ml ずつ分取して 10 μ l を SDS-PAGE に供試した後に, 抗 chIL-6 モノクローナル抗体 E3 を用いてバンドを検出した. その結果, 溶出分画のみに H-chIL-6 を示す分子量約 65 kDa のバンドが検出された (図 31, レーン 3, 4).

続いて, 精製原核型 rchIL-6 を標準試料としたウエスタンブロット解析により, 溶出分画中の H-chIL-6 の定量したところ, CHO-K1 培養上清由来溶出分画は 0.25 μ g/ml (20 倍濃縮で 5 μ g/ml) の濃度であることが分かり, H-chIL-6 は 100 ml 培養スケールの CHO-K1 から約 5 μ g 回収できることがわかった. また, 同様に COS-7 由来培養上清中の H-chIL-6 の濃度を検討したところ, 100 ml の培養スケールから 2.4 μ g 回収できることがわかった.

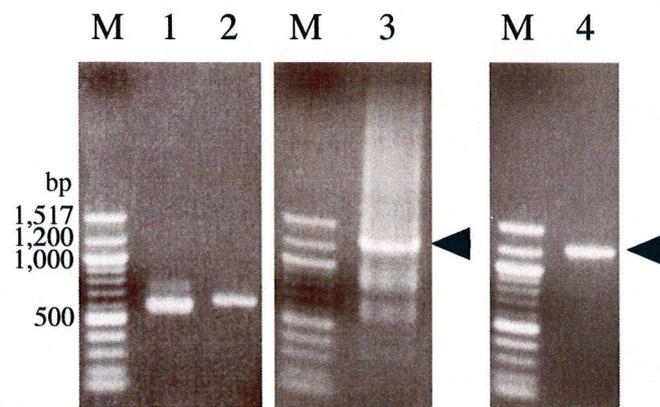


図28. アッセンブリー，再増幅反応によるH-chIL-6 遺伝子の増幅

- レーン1 ; chIL-6R D2D3 領域
- レーン2 ; 成熟型chIL-6
- レーン3 ; アッセンブリー，再増幅反応後のH-chIL-6
- レーン4 ; 切り出し精製後のH-chIL-6
- M ; 100 bp 分子量マーカー (New England Biolabs)
- ◀ ; H-chIL-6

1	GTGGAAGAGCCCCCGAGCCCCCCACGTTTCCTGCTCCCGGCGCAGCCACGACAAAGATGTGCTC V E E P P E P P H V S C S R R S H D K D V L	22
67	TGCGAGTGGCGGCCCGCGCATCGCCGGCTCCGGGCACGCGAGCGGTGCTATGGATGAAGCGCAGG C E W R P R A S P A P G T R A V L W M K R R	44
133	TTCACAATGGAGAACGCGACGGAGCAGCGGTGCCACTTCTACTCCGCGGCGCAGAAATTCGTCTGC F T M E N A T E Q R C H F Y S A A Q K F V C	66
199	CGGGTGAAGGTTCCGCCCCGACCCGACGACACCAAAGCCCTCGTGGTGTCCGTCTGCGTCAGCAGC R V K V P P G T D D T K A L V V S V C V S S	88
265	CGCGCGGGGAGCGCCGCGCGGAGGACCGCATCTTACCCTCAATGGCATCCTGAAGCCGGACCCC R A G S A A A E D R I F T L N G I L K P D P	110
331	CCCCTGAACGTGACGGTGGAGGCAGTGGAGCGTTCCCCACAGCGGCTGTGCGTGCCTGGAGTTAC P L N V T V E A V E R S P Q R L C V R W S Y	132
397	CCCCCTCCTGGGACCCCCGCTTCTATTGGCTGCGCTTCCAGGTGCGCTACCGCCCCGAGCCGGCC P P S W D P R F Y W L R F Q V R Y R P E P A	154
463	CCGAACCTCACCCAGGTGGACCAGGTGACGCGGACGTGGTTGGACATCCGTGATGCCTGGCGTGGC P N F T Q V D Q V T R T W L D I R D A W R G	176
529	ATGCGGCACGTGGTACAGGTGAGGGCACAGGAGGAGTTTGGGCACGGAGCGTGGAGCGAATGGAGC M R H V V Q V R A Q E E F G H G A W S E W S	198
595	CGGGAGGCGGTGGGCACCCCCTGGACAGAGAGAGGAGGAGGTGGCAGTGGAGGAGGCGGATCAGTA R E A V G T P W T E R G G G G S G G G G S V	220
661	GAAACCGCTGCCCCGCGCGGACTCGTCCGGAGAGGTTGGGCTGGAGGAGGAGCGGGGGCGCGG E P L P A A A D S S G E V G L E E E A G A R	242
727	CGGGCGCTGCTCGACTGCGAGCCGCTGGCCCGGTGCTGCGCGACCCGCGCCGTCCAGCTGCAGGAC R A L L D C E P L A R V L R D R A V Q L Q D	264
793	GAGATGTGCAAGAAGTTCACCGTGTGCGAGAACAGCATGGAGATGCTCGTCCGGAACAACCTCAAC E M C K K F T V C E N S M E M L V R N N L N	286
859	CTGCCCAAGGTGACGGAGGAGGACGGCTGCCTGCTCGCCGGCTTCGACGAGGAGAAATGCCTGACG L P K V T E E D G C L L A G F D E E K C L T	308
925	AAGCTCTCCAGCGGCCTGTTTCGCCTTTCAGACCTACCTGGAATTCATTCAAGAGACTTTCGATAGC K L S S G L F A F Q T Y L E F I Q E T F D S	330
991	GAAAAGCAGAACGTGAGTCTCTGTGCTACAGCACAAAGCACCTGGCGGCCACGATCCGGCAGATG E K Q N V E S L C Y S T K H L A A T I R Q M	352
1057	GTGATAAATCCCGATGAAGTGGTCATCCAGACTCGGCCGCCAGAAATCCCTCCTCGCCAATCTG V I N P D E V V I P D S A A Q K S L L A N L	374
1123	AAGTCAGATAAGGACTGGATAGAGAAAATCACCATGCACCTCATCTCCGAGACTTTACTTTCGTTT K S D K D W I E K I T M H L I L R D F T S F	396
1189	ATGGAGAAGACCGTGAGGGCCGTTTCGCTATTTGAAAAAGACCAGGAGTTTCAGTGCC M E K T V R A V R Y L K K T R S F S A	413

図29. H-chIL-6 の塩基配列と予想されるアミノ酸配列

1 ; chIL-6R D2D3 領域 (102-309 残基)

2 ; 成熟型chIL-6 (48-241 残基)

□内 ; リンカー配列

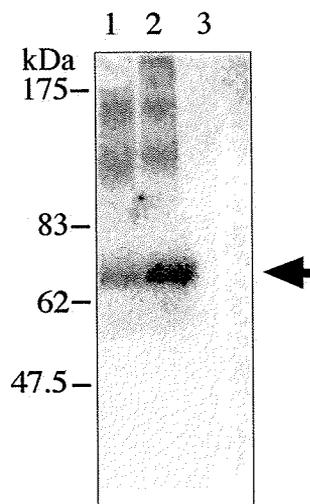


図30. CHO-K1 培養上清中のH-chIL-6 の検出

- レーン1 ; chIL-6R 発現ベクター導入24 時間後の培養上清
 レーン2 ; chIL-6R 発現ベクター導入48 時間後の培養上清
 レーン3 ; 非導入細胞由来(48 時間培養) 培養上清 (陰性対照)
 ← ; H-chIL-6

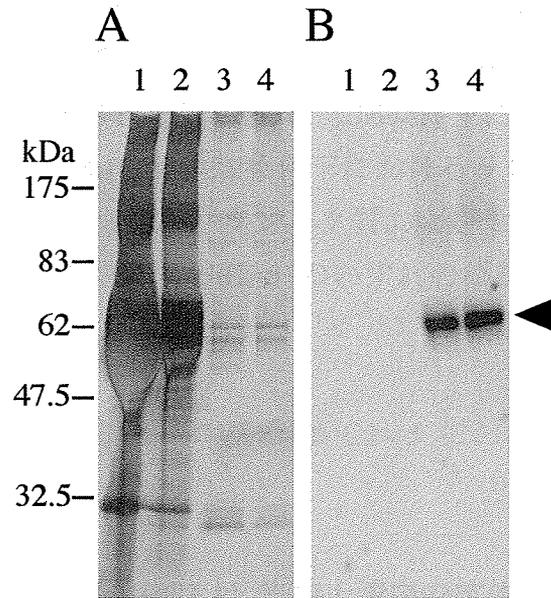


図31. CHO-K1 培養上清由来H-chIL-6 のアフィニティー精製像

A; CBB 染色像

B; ウェスタンブロット解析像 [抗chIL-6 モノクローナル抗体 (E3) で検出]

レーン1 ; 未吸着分画
 レーン2 ; 洗浄分画
 レーン3 ; 溶出分画1
 レーン4 ; 溶出分画2
 ▲ ; H-chIL-6

(4) H-chIL-6 添加条件下の HUC2-13 内チロシンリン酸化 STAT3 およびセリンリン酸化 MEK1/2 の検出

同モル濃度 (0.005-5 nM) の chIL-6 または H-chIL-6 添加後の HUC2-13 内 STAT3 および MEK1/2 のリン酸化を, ウェスタンブロット解析により検討した. その結果, 図 32 に示すように, HUC2-13 内の STAT3 タンパク質の量は, chIL-6 および H-chIL-6 のいずれの添加条件下でも変化していなかったが, チロシンリン酸化 STAT3 タンパク質は, rchIL-6, H-chIL-6 添加条件共に濃度依存的に増加していた. この内, 20 ng/ml (0.5 nM) および 200 ng/ml (5 nM) H-chIL-6 添加条件下におけるリン酸化 STAT3 タンパク質は, 同モル濃度の chIL-6 添加条件下におけるリン酸化 STAT3 タンパク質よりも増加していた. 一方, MEK1/2 タンパク質およびセリンリン酸化 MEK1/2 タンパク質の量は, rchIL-6 および H-chIL-6 のいずれの添加条件でも変化していなかった.

(5) chIL-6 または H-chIL-6 添加条件下の HUC2-13 における各遺伝子の発現解析と抗体タンパク質の検出

はじめに, 各培養条件下の HUC2-13 培養上清中の抗体タンパク質の検出を行った. その結果, chIL-6 添加条件では, 培養 8 時間後以降, 非添加条件に比べて抗体量が増加していた. しかし, H-chIL-6 添加条件では, いずれの培養時間も非添加条件とほぼ同じ抗体量が検出された (図 33).

続いて, 各培養条件下のリン酸化 STAT3 の検出を行った. その結果, 非添加条件では, 培養 12 時間後までリン酸化 STAT3 の量が変化していなかったが, 培養 24 時間後に減少していた. 次に, chIL-6 添加条件では, 培養 2 時間後から非添加条件よりもリン酸化 STAT3 が多く検出され, 培養 12 時間後まで経時的にリン酸化 STAT3 が増加していたが, 培養 24 時間後に減少していた. 最後に, H-chIL-6 添加条件では, 培養 2 時間後から chIL-6 添加条件よりもリン酸化 STAT3 が多く検出され, ほぼ同レベルのリン酸化 STAT3 が培養 12 時間後まで検出されたが, 培養 24 時間後にリン酸化 STAT3 の量が減少していた.

最後に, 同条件下で回収した RNA を元に合成した cDNA を用いて各遺伝子 (VH, VL, SOCS3, C/EBP β , C/EBP γ および BiP) の発現解析を行った. その結果, VL, C/EBP γ および BiP の発現量は, chIL-6, H-chIL-6 添加, 非添加のいずれの培養条件に関わらず変化していなかった. SOCS3 の発現量は, いずれの添加, 非添加条件でも培養 8 時間後まで経時的に増加しており, 特に chIL-6 および H-chIL-6 添加条件では, 培養 12 時間後以降非添加条件に比べて増加していた. この内, chIL-6 添加条件では培養 12

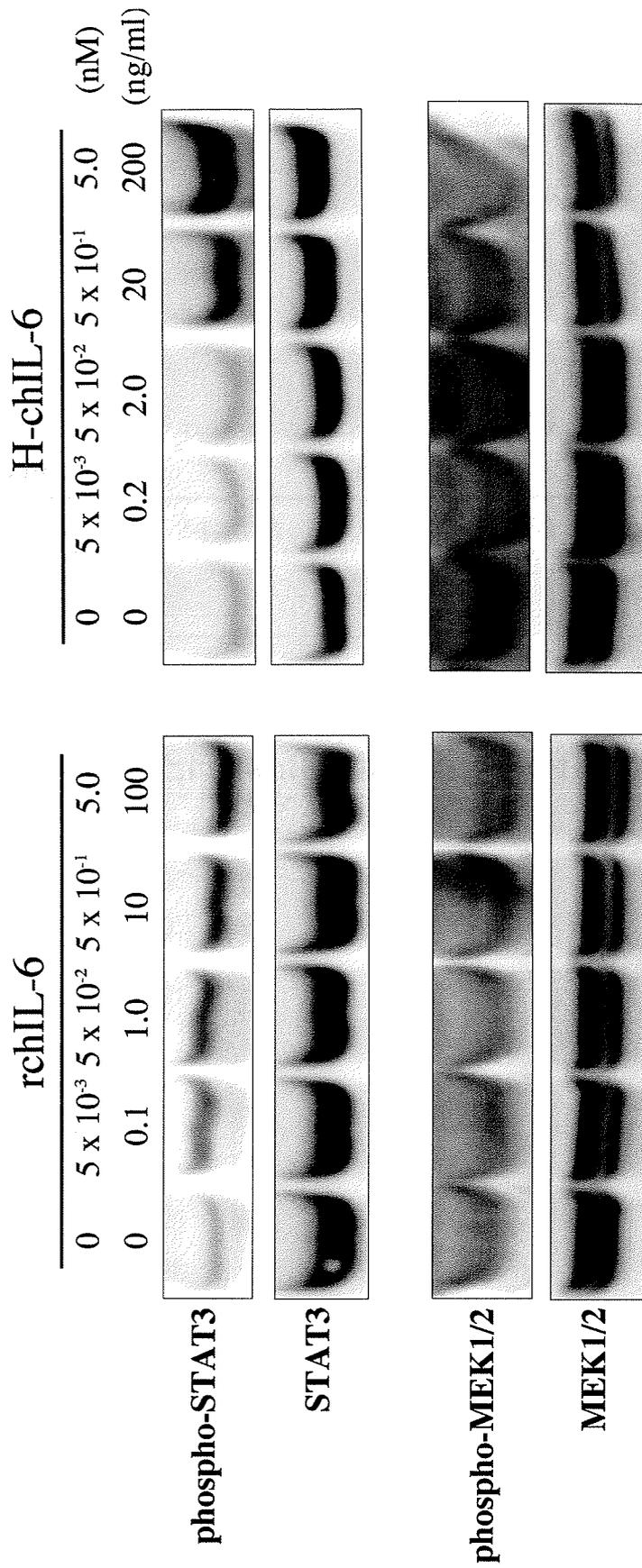


図32. 同モル濃度のchIL-6またはH-chIL-6添加HUC2-13内のチロシンリン酸化STAT3およびセリンリン酸化MEK1/2の検出

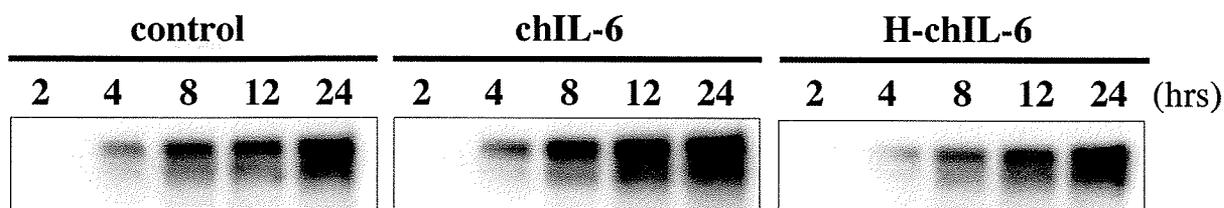


図33. chIL-6 またはH-chIL-6 添加条件下のHUC2-13 培養上清中
抗体タンパク質の検出

時間後をピークに、培養 24 時間後では発現量が減少していたのに対して、H-chIL-6 添加条件では培養 24 時間後もさらに発現量が増加していた。C/EBP β の発現量は、非添加条件では培養 8 時間後まで緩やかに発現量が増加し、その後経時的に減少していた。chIL-6 添加条件では、培養 12 時間後まで経時的に増加しており、非添加条件よりも発現が強かったが、培養 24 時間後に減少していた。H-chIL-6 添加条件では、培養 2 時間後から 4 時間後にかけて発現量が増加していたが、以後培養 24 時間後までほとんど変化していなかった。最後に、VH の発現量は、非添加条件および H-chIL-6 添加条件共に培養 12 時間後までわずかに増加した後に、培養 24 時間後では若干減少していた。それに対して、chIL-6 添加条件では、他の 2 条件と同様培養 12 時間後まで経時的に増加した後に減少していたが、他の 2 条件よりも発現量が高かった (図 34)。

(5) EMSA 試験

a. SOCS3, C/EBP β および VH 遺伝子プロモーター領域の転写因子結合配列の検索

ゲノム PCR により決定した HUC2-13 重鎖転写開始点付近の配列は 363 bp であり、Reynaud らの報告した germline 型 [107] (材料と方法と同一の配列) と 99.4% の相同性であることがわかり (データは示していない)、開始コドンから 104 bp 上流まで配列を得ることができた。C/EBP β は、NCBI データベース上に DNA の配列として登録されており (NCBI under accession number AY212285)、開始コドンから 1487 bp 上流まで配列を得ることができた。また、SOCS3 に関しては、第三染色体上に存在すると考えられる DNA contig (NCBI under accession number NW_060341.1) 上に存在することがわかり、開始コドンから 472 bp 上流までが明らかとなった。続いて、得られた各ゲノム DNA の開始コドン上流の塩基配列中の転写因子結合配列を検索した結果、SOCS3 には、開始コドンから 390 bp 上流の位置に TATA ボックス (score= 98) が、426 bp 上流の位置に STAT の結合配列 (score= 94) が存在していた。C/EBP β には、275 bp 上流の位置に TATA ボックス (score= 94) が、1099 bp 上流の位置に STAT タンパク質の結合配列が (score= 86) が存在していた。また、VH には 50 bp 上流の位置に TATA ボックス (score= 90) が、80 bp 上流の位置に C/EBP の結合配列 (score= 90) が存在していることがわかった (図 35)。

b. EMSA 試験

C/EBP β プローブと chIL-6 または H-chIL-6 で 15 分間刺激または無刺激で培養

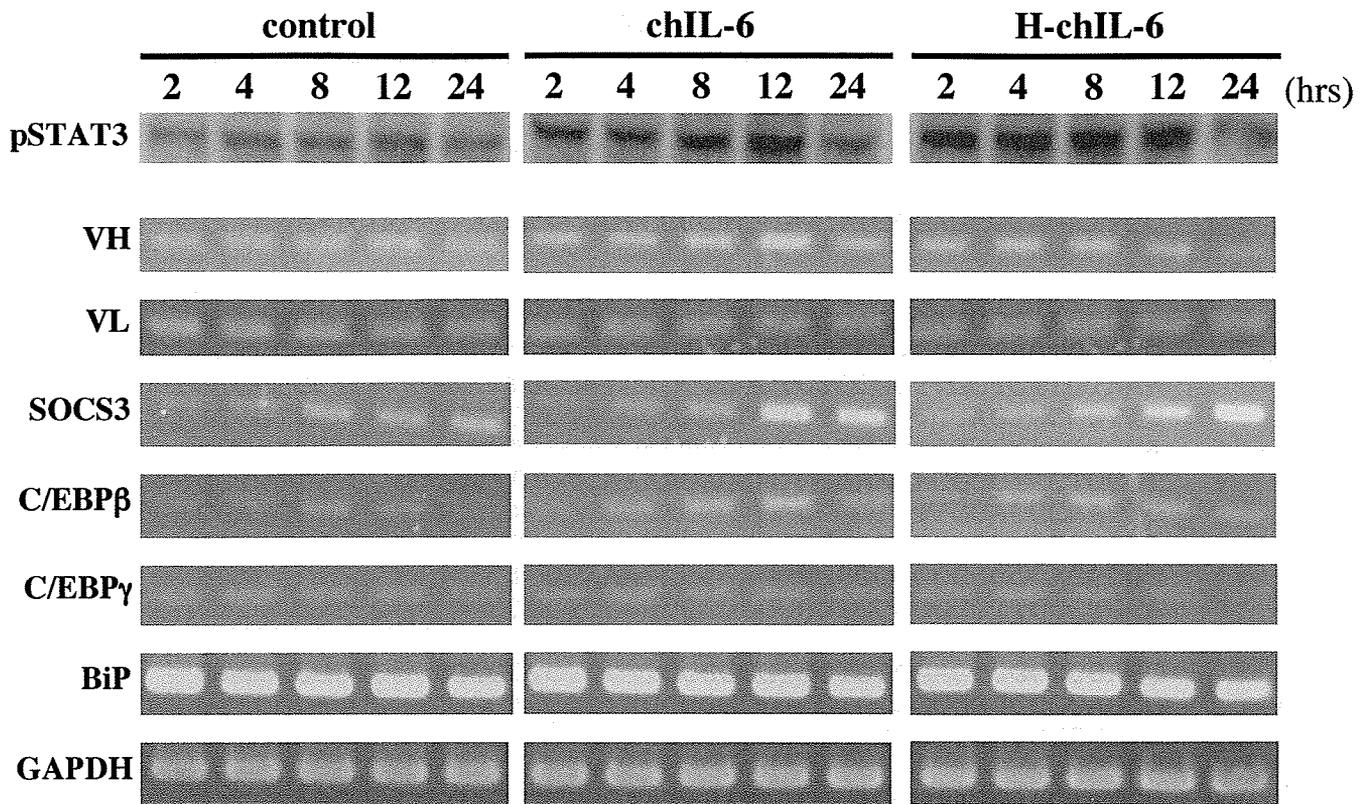


図34. chIL-6 またはH-chIL-6 添加条件下におけるHUC2-13 抗体および各遺伝子の発現解析

A

5'-GATCGCGCGGGGAGGGCGCCGGGGAGCATTACAAGAAGCCGCGCAT **TTCC** 46516

AGGAAGAACCCGAGGGCGGGCTCACCGCCCGC **TATAATA**GGCCTCCCCGG 46566
 STATx TATA box
 GCGGCCCCGGCAGCTCCGCCGCCGTCCGCCGCCGCACACTGAGCCCCGCG
 CCCC GGCCGCCACCGAGACCAGCACTGCGCCCCAGGTACCGGCACGGGAC
 GGGACGGGGGAGGCGGGGAGGGTCCCCCGTGGAGGGGAGAAGCCGGGAC
 TTAGGGTGTCTCCGGGATGGATGTCCGGTAACGTGTCCCGGGGAGTGGAGA
 TGGCGGGGGGGGCATCCCGGGATGGAGGCGGGAAGGCCGGGCCGGGGGT
 GCCCGGGGGGGGTCCGGTTCGGGGCTGCCGAGTCTCACCGCCGTCTGTGC
 CGCAGGTGATGGTGTAGCGGCCGCTGCTCCCGGCAGCAGCACCCCGAGCG
 CGCAAAGCTGGCTCCGTGCGC **ATG**GTCACCCA -3' 46949

B

5'-TTCTGAAAATGCCTGGATTCCATGGTTCTGAGCACGTATCTCACTCTC **TT** 50

TCAGGAATGCCTTTAAACACGGTCCCCTCTGGCTTCAGAGCGCAGATTCC 100
 STATx
 CTGTTCGCTTTGTACCCTGACAGTTGCACCGTATCGTGC AAAAGTAAATAC
 ACCAAGGCAAAC TTCAGTACC GTTCCC GCATGCAGAGATGGGGAGCGGA
 GCTCGGCTCTGACTGCTCGCGGCCGTCAAGAAGGAAGCCGGGAGTGCACG
 GTGCCCGCTCCAAACTGCGCTCACTTGGCTCTCCGCTTGTCTTTGTA
 ATGGTTCTGCACACGTCTGTATGGGACGGTTCTGCCTGCCAGTGC GGTTT
 ACTCAATCAGGCACTGGACGGAGAATAAGAGGATCTGTCTTCTATTTGCA
 GCTTTTTTCCCCCTGCTTTGGCAAAGAGCTTGGAAAACGCCTTCTGCCT
 CGATTTCCCAGGGGTAAAACGCGACCCAGACGGGTTTTGCACCCAATTC
 TGCGCGGCACACGCAGCCCCACAGCGCAACCCTTCCTCTCAGACGCAA
 AGGCCCGGCCTTGC ACTGGCAAAGGGCAGCGGGCGGCCCCCGCAGCCGT
 GTCCCGGTCCCGCAGCCGCTCCGGGCGGAGCGGTGCCCGCGTTCCCTGCA
 GTCGAGGGACCAGGACGGGACGTGAGATCTCGGCAGCCTCGCTGCCGGCG
 GCGGGCGCTTCGTGCGGTCCCGTTCGCGCTCCTGCAGAGCGGCCCCAGG
 GCCCGCACCGCACCGCACCCGAGCCGGCGGCGTCCCGGGGGCCGGAGCG
 GCAGCTCCGAAGCGTGCAGCGTGGCATGCGGCCAGGCGGTGACGCGCCTG 850
 TTGCTATGGGATTCACCGCCCC **TATAAATA**ACCGAGCGAAGGAAC TTTCC 900
 TATA box
 TAAGTCAGAGACTTAAGGACACGGGCCCCGCAACCAGATGGTCCGCAGGA
 GAGCCGCCAGCTCCAGCCGCAGCTCCGGGAGCGGGAGAGCCCCGCCGCGC
 CGCACGGACTGAGACGCCCCGGCGGGCAGCGCAGCGGGCCGTGCCAGCGC
 CGGGCTCGGGAGACCCACCTGACGACGGCCGCTCGATCCCGTGCCGGG
 GGGGssCCAGCGCCGTCTTCTCCTCCCCGCATCCCCCTTTGCTTTC **ATG** 1150
 CAACGCCTGG -3' 1160

C

5'-ACGCGCTAAAGGAAGCCGGAGCCC **TCCTTATGCAAATT**AGCCCCCTCCAGA 50

C/EBP
 GGGC **CATAAAA**GCGCCGGCTCTCCGACGGAGGAGCACCAGTCGGCTCCGC 100
 TATA box
 AAC **ATG**AGCCCACTCGTCT -3' 120

図35. 各遺伝子転写開始点上流域の塩基配列および転写因子結合部位の同定

A; SOCS3
 B; C/EBPβ
 C; HUC2-13 heavy chain
 (□: 開始コドン)

した HUC2-13 由来核抽出物を用いた EMSA 試験の結果, いずれの培養条件由来核抽出物を用いた場合でもタンパク量依存的にシフトバンドが検出された (図 36, レーン 1-4). このシフトバンドは, H-chIL-6 で刺激培養した細胞由来核抽出物を用いた場合で最もシグナルが強く (図 36 C), いずれのシフトバンドも非標識プローブの増加に伴って減少していた (図 36, レーン 5, 6). 抗 STAT3 抗体を用いたスーパーシフトアッセイでは, H-chIL-6 で刺激培養した細胞由来核抽出物を用いた場合のみでバンドが検出された (図 36 C, *). 続いて, VH プローブと chIL-6 または H-chIL-6 で 14 時間刺激培養した HUC2-13 由来核抽出物を用いた EMSA 試験では, いずれの培養条件の細胞由来核抽出物を用いた場合でも, タンパク量依存的にシフトバンドが検出された (図 37, レーン 1-4). このシフトバンドは, chIL-6 で刺激培養した細胞由来核抽出物を用いた場合で最もシグナルが強く (図 37 B), いずれのシフトバンドも未標識プローブ添加量依存的に減少していた (図 37, レーン 5, 6). 抗 C/EBP β 抗体を用いたスーパーシフトアッセイの結果, いずれの添加, 非添加条件においてもスーパーシフトしたバンドが検出された (図 37, レーン 8). 最後に, SOCS3 プローブと chIL-6 または H-chIL-6 で 15 分間刺激培養した HUC2-13 由来核抽出物を用いた EMSA 試験では, いずれの培養条件由来核抽出物を用いた場合でもタンパク量依存的にシフトバンドが検出され (図 38, レーン 1-4), 非標識プローブを用いた競合試験によりシフトバンドの減少が観察された (図 38, レーン 5, 6). しかし, 抗 STAT3 抗体を用いたスーパーシフトアッセイでは, いずれの条件でもスーパーシフトしたバンドは検出されなかった.

(6) chIL-6 継続添加の HUC2-13 抗体産生への影響

各培養条件下の HUC2-13 培養上清中の抗体タンパク質を検出した結果, 培養初日のみに chIL-6 を添加した条件では, 最終培養時間である 96 時間後までに非添加条件よりわずかに増加していた. 一方, 培養 1 日毎に chIL-6 を添加した条件では, 培養 48 時間後から他の 2 条件よりも抗体量の増加が認められ, 最終的に培養 96 時間後の抗体量は, 他の 2 条件の抗体量を大きく上回った (図 39 A, B). また, 各培養上条件下における培養 1 日毎の抗体産生量の変化は, 非添加条件および初日のみ添加した条件では, 培養 48 から 72 時間の間で最も抗体産生量が増加しており, 全体的にはほぼ類似した変動パターンを示した. 一方, 連続添加条件は培養 24 から 48 時間および 72 から 96 時間の間に抗体産生量が上昇していた (図 39 C). 特に, 培養 72 から 96 時間における抗体産生量は, 他の 2 条件よりも多くなっていた.

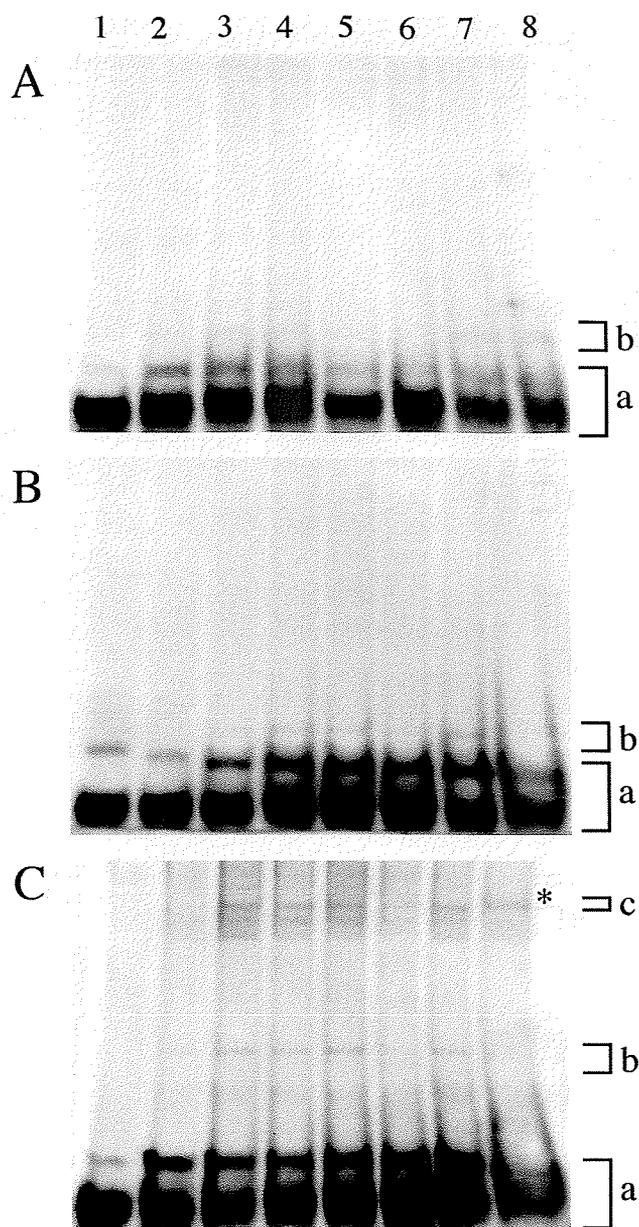


図36. C/EBP β プローブを用いたEMSA 試験

- A. 無刺激核抽出物
- B. chIL-6 刺激核抽出物
- C. H-chIL-6 刺激核抽出物

レーン1; プローブのみ
 レーン2; + 0.1 μ g 核抽出物
 レーン3; + 0.5 μ g 核抽出物
 レーン4; + 1.0 μ g 核抽出物

レーン5; レーン4 の条件 + 1 倍量未標識プローブ
 レーン6; レーン4 の条件 + 10 倍量未標識プローブ
 レーン7; レーン4 の条件 + 抗マウスIgG 抗体
 レーン8; レーン4 の条件 + 抗STAT3 抗体

a; フリープローブ
 b; シフトバンド
 c; スーパーシフトバンド (*)

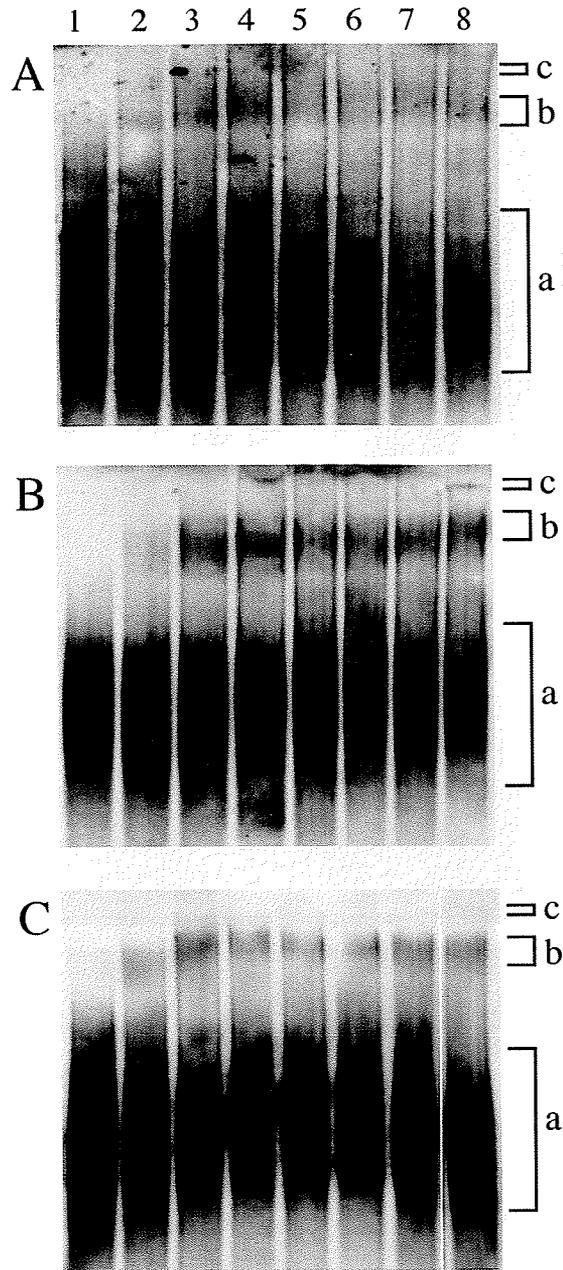


図37. VH プローブを用いたEMSA 試験

- A. 無刺激核抽出物
- B. chIL-6 刺激核抽出物
- C. H-chIL-6 刺激核抽出物

レーン1; プローブのみ
 レーン2; + 0.1 μ g 核抽出物
 レーン3; + 0.5 μ g 核抽出物
 レーン4; + 1.0 μ g 核抽出物

レーン5; レーン4 の条件 + 1 倍量未標識プローブ
 レーン6; レーン4 の条件 + 10 倍量未標識プローブ
 レーン7; レーン4 の条件 + 抗マウスIgG 抗体
 レーン8; レーン4 の条件 + 抗リン酸化C/EBP β 抗体

a; フリープローブ
 b; シフトバンド
 c; スーパーシフトバンド

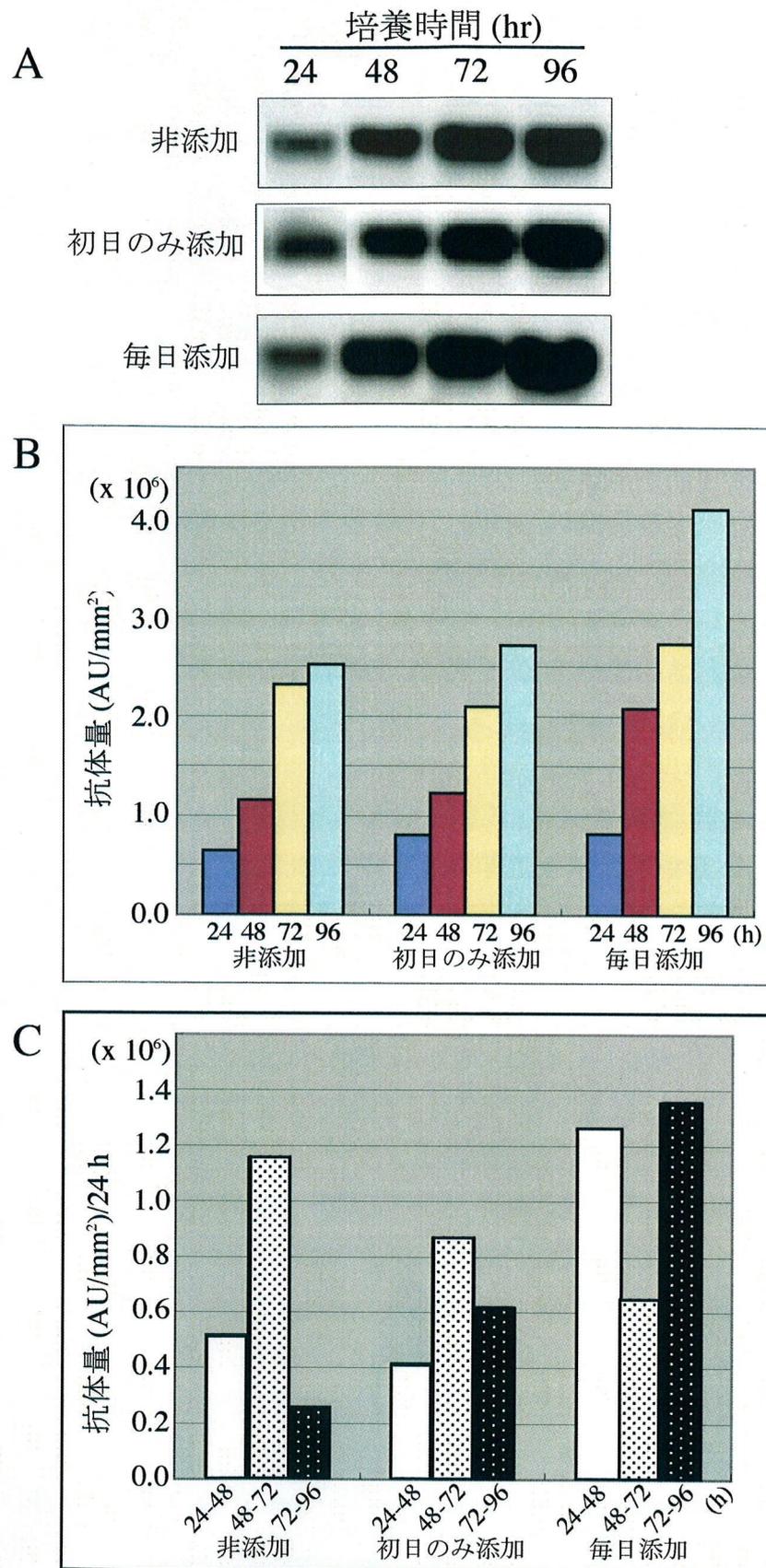


図39. chIL-6 継続添加時におけるHUC2-13 培養上清中
抗体タンパク質の検出

- A; ウェスタンブロットによる抗体の検出
- B; 各培養時間における抗体量
- C; 24 時間毎の抗体量の変化

4.4. 考察

IL-6 のシグナルは、IL-6 特異的レセプターである IL-6R と、シグナル伝達レセプターである gp130 の 2 種類のレセプターを介して細胞内に伝達される。ニワトリにおいて、gp130 はあらゆる組織、細胞で広範囲に発現が認められるが、これまで IL-6R はクローン化されていなかった。筆者は、ニワトリハイブリドーマに対する chIL-6 の有効性を検討していく上で、chIL-6R のクローン化が必要不可欠であると考え、前章において chIL-6R 遺伝子のクローニングを行い、その発現を解析した。その結果、HUC2-13 における chIL-6R の発現量は、gp130 の発現量に比べて極めて低いことが判明した。この結果から、HUC2-13 の培養系に chIL-6R を補充することにより、STAT3 がより強くリン酸化されると考えられた。そこで本章では、1) HUC2-13 への組み換え chIL-6R の導入および発現、2) 真核細胞を用いた H-chIL-6 の作製と HUC2-13 培養系への添加、の 2 種類の方法により、chIL-6R の HUC2-13 培養系への活用を試みた。

まず、HUC2-13 に chIL-6R 発現ベクターを導入して、1 細胞当たりの chIL-6R の発現数を増加させることで、chIL-6 に対する応答性を増大させることを試みた。しかし、HUC2-13 において目的のタンパク質を発現させることができず、結局この試みは成功しなかった。同様に、HUC2-13 に chIL-6 発現ベクター (第 2 章で作製) を導入した場合も、培養上清中に chIL-6 が検出されなかった (データは示していない)。しかし、コントロールとして EGFP 発現ベクターである pIRES2-EGFP を導入した場合、EGFP の発現を示す緑色蛍光が観察されている (図 25)。HUC2-13 で EGFP のみが発現した理由は明確ではないが、1 つの理由として、この現象はタンパク質の性質の違いに起因している可能性が考えられる。chIL-6R と chIL-6 は膜タンパク質および可溶性タンパク質であるのに対して、EGFP は細胞内タンパク質である。真核細胞においては、可溶性または膜タンパク質は、転写後にまずシグナル配列のみが翻訳され、細胞質内に存在するシグナル配列認識分子 (signal recognition particle; SRP) はシグナル配列を認識して結合し、翻訳の進行を一時的に阻害する [110]。翻訳が阻害された転写産物は、小胞体に輸送されると、SRP が解離して翻訳が再開され、タンパク質の合成が終了する。本研究で用いた真核細胞発現ベクターには、シグナル配列としてマウス Igk 鎖が用いられており、組み換えタンパク質はマウス Igk 鎖を用いて分泌または膜状に提示されるが、HUC2-13 内の SRP がマウス Igk 鎖を認識することができずに翻訳が行われなかった可能性がある。それに対して、細胞内タンパク質である EGFP は、可溶性または膜タンパク質のように SRP の翻訳制御を受けないため、細胞内で発現できたと考えられる。しかしながら、同じマウスを用いたベクターでも、ニワトリ肝細胞株である LMH では、chIL-6R が発現してい

る (図 27). このことから, 抗体産生に特化した HUC2-13 は, 他のニワトリ細胞株とは異なり, 外来遺伝子の転写, 翻訳に独特の制御が存在することも考えられる. 従って, 今後, マウスの Igk シグナル配列の代わりに chIL-6R のシグナル配列そのものを用いるか, HUC2-13 抗体のシグナル配列を利用することで, HUC2-13 においても chIL-6R の発現が可能となるかもしれない.

続いて, chIL-6R を HUC2-13 に強制発現させる代わりに, chIL-6R と chIL-6 の融合タンパクである H-chIL-6 を作製し, 同モル量の chIL-6 添加条件とのリン酸化 STAT3 の量を比較した. その結果, H-chIL-6 添加条件では chIL-6 添加条件に比べてリン酸化 STAT3 の量が大きく増加していた (図 32)ことから, H-chIL-6 は chIL-6 に比べてより多くの gp130 とリガンド/レセプター複合体を形成して, 強いシグナルを細胞内へ伝達することが示唆された. この結果から, H-chIL-6 は HUC2-13 に対して chIL-6 よりも高い抗体産生促進効果を発揮することが予想された. ところが, chIL-6, H-chIL-6 添加または非添加条件下で培養した HUC2-13 培養上清中の抗体をウエスタンブロッティングにより検出したところ, chIL-6 添加条件では, 非添加条件に比べて抗体量の増加が認められたが, H-chIL-6 添加条件では, 予想に反して chIL-6 添加条件よりも抗体量の増加は認められず, むしろ非添加条件とほぼ同レベルの抗体量が検出されるにとどまった (図 33). H-chIL-6 は, chIL-6 よりもリン酸化する STAT3 が多く, つまり細胞内により多くのシグナルが伝達されているにもかかわらず, このような結果が得られたことは, chIL-6 添加条件と H-chIL-6 添加条件において, STAT3 のシグナルによって制御される遺伝子群の発現に何らかの違いが生じている可能性が考えられた.

本研究では, chIL-6 または H-chIL-6 添加, 非添加時における HUC2-13 内の抗体遺伝子およびその発現制御に関連すると考えられる因子の発現を解析することで, chIL-6 または H-chIL-6 添加, 非添加時における抗体産生量の違いをもたらし要因に関する情報が得られると考えた. 哺乳類では, 抗体遺伝子の発現に C/EBP β が関与することが報告されている [98]. 本研究では, ニワトリ C/EBP β および SOCS3 遺伝子の転写開始点上流には STAT 結合部位が, HUC2-13 VH 遺伝子の転写開始点上流には C/EBP 結合部位が存在したこと (図 35), またこの知見を元にした EMSA 試験の結果 (図 36, 37) から, HUC2-13 内において STAT3 が C/EBP β および SOCS3 と, C/EBP β が VH と相互作用していることが示唆された. しかし, H-chIL-6 で刺激した場合, C/EBP β プローブと STAT3 の複合体を示すシフトバンドが他の 2 条件よりも強いシグナルとして検出されたにもかかわらず, VH プローブとインタラクトする C/EBP β の量が chIL-6 で刺激した場合よりも少なくなっていたことから, H-chIL-6 添加時において SOCS3 によるネガティブフィードバックが強く誘導された可能性が考えられた. そこで, chIL-6, H-chIL-6 添加, 非添加条件下の HUC2-13 からリン酸

化 STAT3 を検出すると同時に、同培養条件下の cDNA を用いた RT-PCR により各遺伝子の発現を解析することで、JAK/STAT シグナル経路と抗体遺伝子および発現制御因子の発現の関連性を検討した。chIL-6, H-chIL-6 添加または非添加で培養した HUC2-13 における各遺伝子の発現の変動パターンを RT-PCR により解析した結果、非添加条件では、リン酸化 STAT3 の量的変化に合わせて、C/EBP β , VH および SOCS3 遺伝子の発現量が増加していた。HUC2-13 は、chIL-6 の刺激が無くてもリン酸化 STAT3 の微弱なバンドが検出されることから、HUC2-13 自身がオートクラインで STAT3 をリン酸化する IL-6 ファミリーサイトカインを産生していることが予想される。よって、外から chIL-6 を添加しなくても、微量ながらリン酸化 STAT3 が常に存在する状況が形成されていると考えられる。一方、chIL-6 添加条件でも、非添加条件と同様、リン酸化 STAT3 の量的変化に合わせて C/EBP β , VH および SOCS3 遺伝子の発現量が増加していた。しかし、chIL-6 添加条件は、非添加条件よりもリン酸化 STAT3 の量が増加しており、それに合わせて C/EBP β , VH および SOCS3 遺伝子の発現量も増加していたことから、EMSA 試験の結果と合わせて、これらの遺伝子が JAK/STAT シグナル伝達経路の制御下にあることが示唆された。一方、VL は、chIL-6 の添加、非添加に関わらず発現量が増加していなかった。哺乳類では、軽鎖遺伝子の転写は重鎖遺伝子と同様、C/EBP β に制御されているといった報告がある [111] が、それは *in vitro* での結果に基づいたものであり、実際に細胞内で C/EBP β により発現制御を受けているのか不明な点も多い。ニワトリにおいても、データベースに登録されているニワトリイムノグロブリン軽鎖遺伝子 (NCBI under accession number M15095) [112] の転写開始点上流域の転写因子結合部位を検索したところ、C/EBP の結合配列が存在することが判明したが (データは示していない)、本研究では、chIL-6 の添加、非添加に関わらず VL の発現量が増加していなかったことから、HUC2-13 では VL の発現は chIL-6 のシグナルの制御を受けていないと考えられる。以上の結果から、chIL-6 添加による HUC2-13 抗体産生量の増加は、STAT3 のシグナルを介した VH 遺伝子の発現量の増加に負うところが大きいものと思われる。

chIL-6 の添加は、非添加条件よりも HUC2-13 内リン酸化 STAT3 の量を増加させることで、各遺伝子の発現量を増加させて HUC2-13 の抗体産生能の上昇をもたらすことが示唆された。これに対して、H-chIL-6 添加条件下の HUC2-13 内 C/EBP β , VH および SOCS3 遺伝子の発現パターンは、非添加および chIL-6 添加条件における各遺伝子の発現パターンとは異なっていた。リン酸化 STAT3 の量は、高いレベルで維持されており、SOCS3 遺伝子の発現は、経時的に増加する一方であった。一方で C/EBP β および VH の発現量はほとんど変化しておらず、むしろ減少する傾向であったことから、H-chIL-6 の添加により各遺伝子の発現が正常に制御されていない可能性が考えられた。SOCS3 は、JAK/STAT シグナル経路のネガティブフィードバック因子で

あり、chIL-6 添加条件においても SOCS3 の発現量の上昇に伴いリン酸化 STAT3 の減少が観察されたが、H-chIL-6 添加条件、特に培養 24 時間後におけるリン酸化 STAT3 の急激な減少と、SOCS3 遺伝子の強い発現上昇が観察された。哺乳類では、IL-6 シグナルにおける負の制御は、SOCS3 以外にも SHP2 や PIAS の関与が報告されているが、本研究での培養 24 時間後における現象は、HUC2-13 内の IL-6 シグナルの負の制御には、SOCS3 が特に大きく関与していることを強く示唆している。また、IL-6 は、はじめに特異的レセプターである IL-6R と結合し、その後シグナル伝達レセプターである gp130 と結合し、2 ステップでリガンド・レセプター複合体を形成する。しかし、H-chIL-6 ははじめから強制的に chIL-6 と chIL-6R が複合体を形成しており、1 ステップで gp130 とリガンド・レセプター複合体を形成する。そのことにより、chIL-6 添加条件よりもシグナルが細胞内へ迅速に伝達された可能性が高い。急激なシグナルの増加は、細胞 (生体) の恒常性の面から考えると、細胞内に過酷な環境を作り出したとも考えられる。今後、chIL-6R に関しては、先にも述べたように HUC2-13 への chIL-6R の発現を再度試みて、ニワトリハイブリドーマ培養系へ活用する必要があるかもしれない。

chIL-6 添加による HUC2-13 抗体産生量の上昇は、リン酸化 STAT3 の増加によって C/EBP β の発現量が上昇し、結果 VH の発現量が上昇することによりもたらされることが示唆された。しかし、chIL-6 のシグナルは同時に SOCS3 の発現量を上昇させ、ネガティブフィードバック阻害により、培養時間の経過と共にリン酸化 STAT3 の量の減少が観察された。このことから、chIL-6 は、HUC2-13 に対して一度だけ加えるのではなく、継続的に添加することで STAT3 のリン酸化がある程度持続され、結果としてより抗体産生促進効果が高まることが予想された。そこで、chIL-6 を培養 1 日毎に添加して、初日のみに添加した培養条件下の HUC2-13 抗体産生量と比較したところ、継続添加することで抗体量が増加傾向を示しており (図 39)、chIL-6 の継続添加がニワトリハイブリドーマの抗体産生量を増加させるのに有効であることが示された。この現象は、継続添加することにより chIL-6 がある程度の濃度で常に培地中に存在することにより (しかも H-chIL-6 添加時のように一度に大量のシグナルが入ることなく) STAT3 のリン酸化がある程度持続された結果であると考えられる。また、これまでは chIL-6 の至適添加量を STAT3 のリン酸化のレベルにより決定してきたが、今回、連続添加した条件が初日のみに添加した条件に比べて常に chIL-6 が高い濃度で存在し、その結果抗体産生量がさらに増加したのであれば、これまでの chIL-6 添加量が、抗体産生量を促進するには十分な量でなかったことを考えられる。本研究からも得られたとおり、chIL-6 シグナルによるリン酸化 STAT3 は、C/EBP β のみを制御しているわけではないので、今後は抗体産生量を元に chIL-6 の添加条件を決定すれば、より抗体産生能を上昇させることが可能となるかもしれない。

い.

本章では、chIL-6 または H-chIL-6 を添加した時の HUC2-13 の抗体産生量と、抗体遺伝子およびその発現制御に関与すると考えられる遺伝子の発現を解析して、chIL-6 による STAT3 のリン酸化と抗体遺伝子の発現の関連性を検討した。その結果、chIL-6 は、STAT3 をリン酸化、C/EBP β の発現上昇を経て VH の発現量を上昇させ、HUC2-13 抗体産生量の上昇をさせることが示唆され (図 40)、哺乳類の IL-6 による抗体産生に関与する C/EBP β がニワトリハイブリドーマの抗体産生においても重要な因子である可能性が強く示唆された。chIL-6 よりもより多くの STAT3 をリン酸化し、高い抗体産生促進効果が期待された H-chIL-6 であったが、ニワトリハイブリドーマ培養時に一度に多くのシグナルが伝達されると、それに伴って「負の制御」も強く引き起こされることが示唆された (図 41)。よって、一度に大量のシグナルを伝達するのではなく、ある程度のレベルで持続的にシグナル伝達している環境を形成する chIL-6 の継続添加が、ニワトリハイブリドーマに対する最も有効な chIL-6 活用法であることが示された。しかし、哺乳類では、C/EBP β によるイムノグロブリン重鎖遺伝子の発現制御は、プロモーター領域に加えてエンハンサー領域にも及ぶことが報告されている [111]。エンハンサー領域は、クラススイッチの際に重要な S μ 配列の 5' 上流に存在し、ニワトリ抗体遺伝子にもその存在が報告されている [113]。実際、HUC2-13 の S μ 配列の 5' 上流の遺伝子中の転写因子結合配列を探索したところ、C/EBP 結合部位が 9 カ所存在することが判明し (データは示していない)、HUC2-13 においても C/EBP β とエンハンサー領域との関連性が示唆された。しかし、9 カ所のいずれの結合部位が転写活性に重要であるのか、それとも根本的に転写制御される部位であるのか現在のところ不明である。今後、いずれの C/EBP 結合部位が重要であるか、*in vitro* でのルシフェラー活性を利用したプロモーターアッセイなどを用いて解析する必要がある。また、哺乳類における抗体遺伝子の転写制御には、特にプロモーター領域に関しては、C/EBP β 以外にオクタマーファクターである Oct-1、Oct-2 [114, 115, 116, 117] や、B 細胞特異的なコファクターであり Oct-1、Oct-2 と結合してオクタマー依存的な抗体遺伝子の転写を促進させる Bob-1 (OCA-B, OBF-1) [118, 119] が関与している。特に、Oct-1 および Oct-2 は、C/EBP β の結合配列の近傍またはオーバーラップする形で結合配列が存在し、C/EBP β と 3 量体を形成することから、C/EBP β と並んで抗体遺伝子の転写において重要な転写因子である。本研究で決定した HUC2-13 VH の転写開始点上流には、C/EBP 結合配列が存在した (図 35) が、それにオーバーラップする形で Oct-1 の結合配列が存在していた (データは示していない)。この結果は、ニワトリにおいても Oct-1 が抗体遺伝子 (VH) の発現に関与している可能性を示唆しており、今後 Oct-1 とニワトリ抗体遺伝子との関連を検討する必要があると考えられる。また、抗体遺伝子の転写を制御する転写

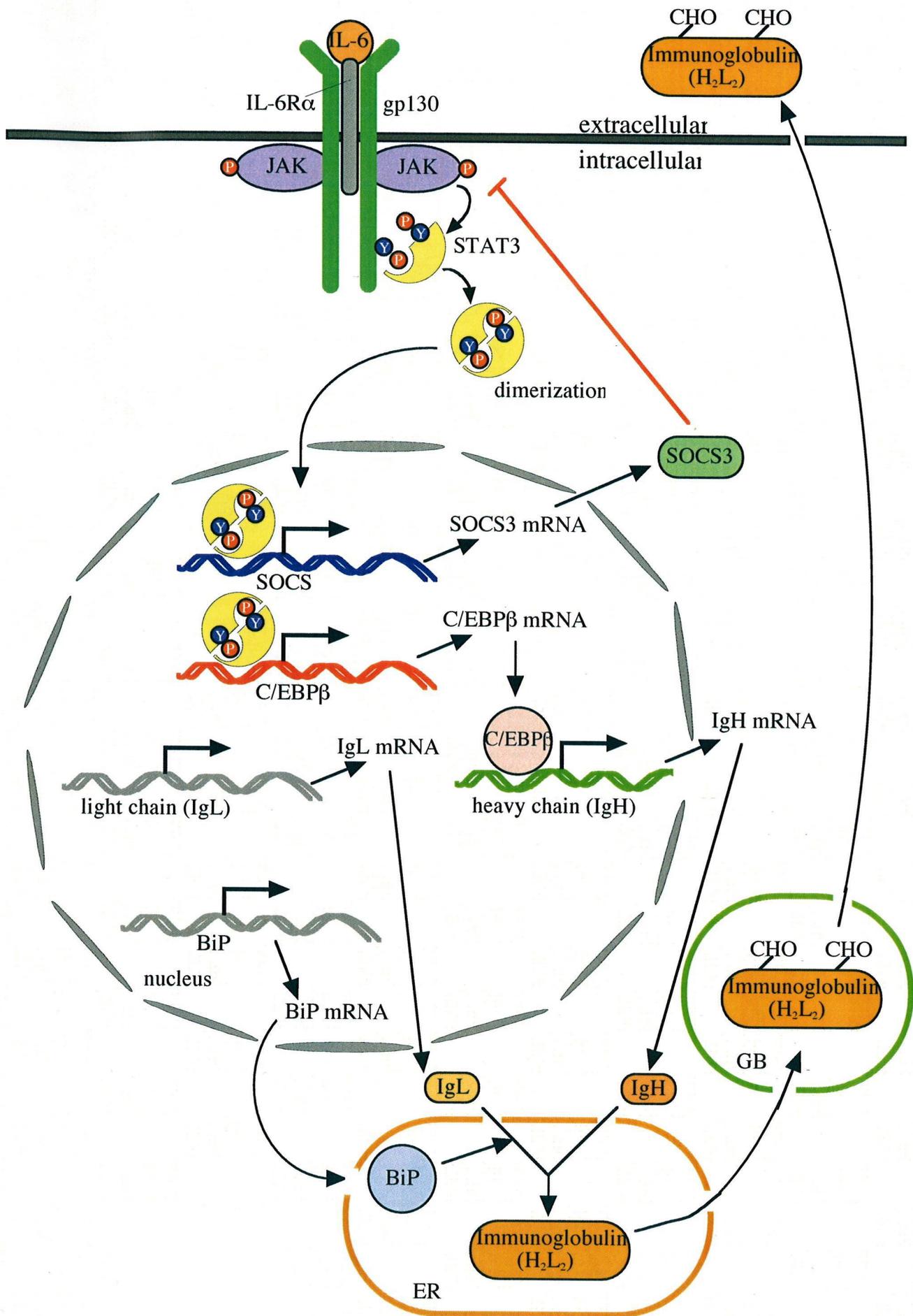


図40. HUC2-13 内のchIL-6 シグナル伝達と抗体分子産生機構の概要図

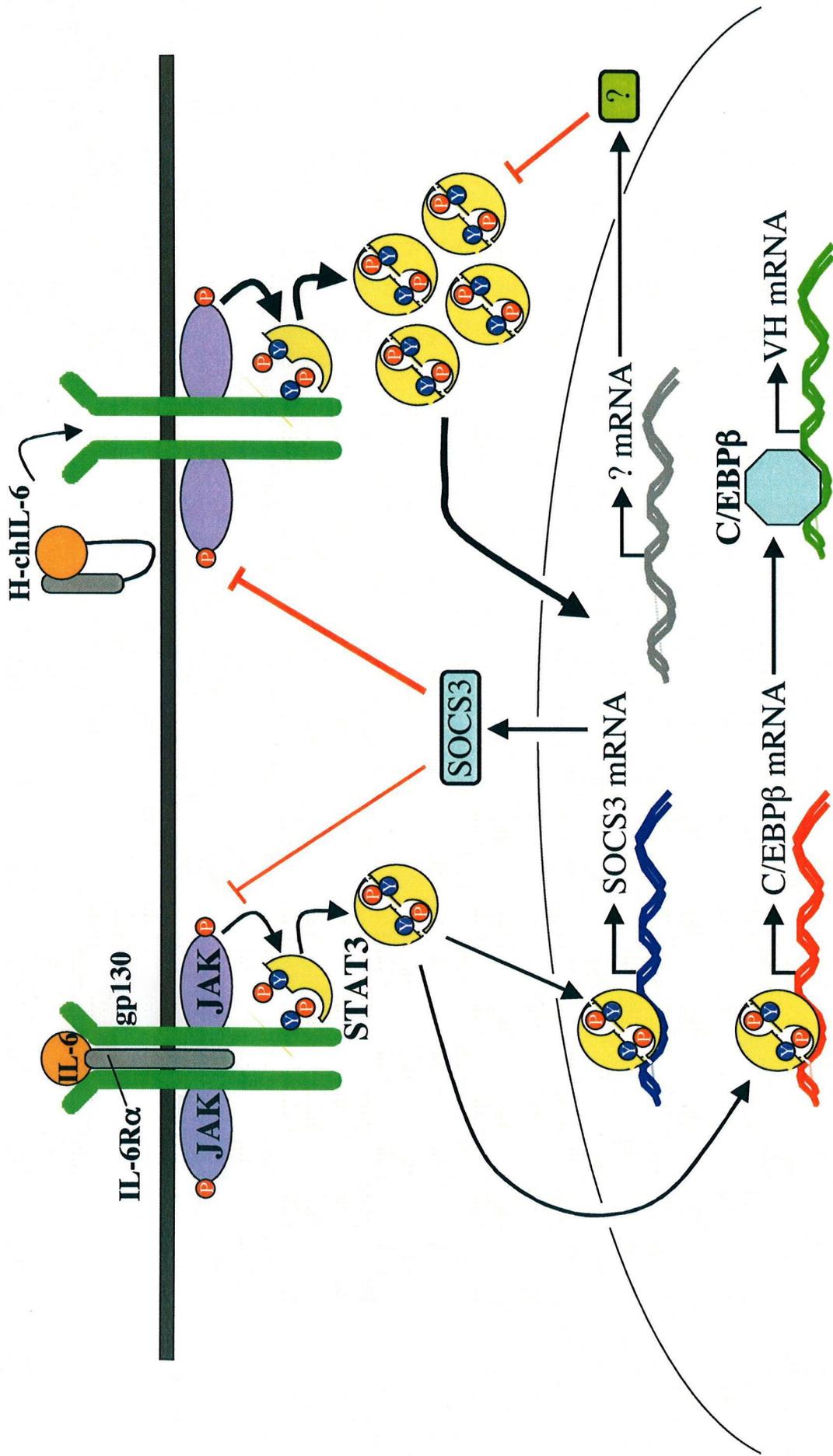


図41. chIL-6 またはH-chIL-6 添加HUC2-13 内のシグナル伝達と抗体産生機構

因子は、哺乳類との共通因子である C/EBP β や Oct-1 など以外にも、ニワトリ独自の転写因子の関与する可能性も考えられる。今後、HUC2-13 転写開始点上流域遺伝子の DNA カラムを利用して、特異的に結合してくるタンパク質を解析することで、ニワトリハイブリドーマ抗体遺伝子の転写機構がさらに解析され、これらの知見と chIL-6 を活用することで、ニワトリハイブリドーマ抗体タンパク質の大量調整にさらに寄与できると考えられる。

また、本研究では言及しなかったが、ニワトリハイブリドーマの細胞融合実験において、chIL-6 を添加することにより融合効率が改善されるといった結果も得られている。融合効率の上昇は、新規ハイブリドーマを作製する際、高反応性のクローンを取得するのに非常に有効であると考えられることから、今後細胞融合実験における chIL-6 の積極的な活用も視野に入れていきたい。

第1章 緒言

IL-6 は、T 細胞、B 細胞、単球、マクロファージおよび肝細胞など種々の細胞の活性化および分化に關与する重要な多機能生サイトカインである。IL-6 は、IL-6 特異的受容体 IL-6R と、シグナル伝達受容体 gp130 を介して細胞内にシグナルを伝達する。IL-6 のシグナルは、主に JAK/STAT シグナル経路により伝達されるが、このシグナルは、ネガティブフィードバック因子である SOCS3 に代表されるような阻害因子により「負の制御」を受け、必要以上のシグナル伝達を自身で抑制する機構を持っている。

近年、ニワトリの卵黄抗体 (ポリクローナル抗体) が臨床診断や検査薬の分野で注目されているが、その要因の一つは、ニワトリが進化の点で哺乳類と大きく異なる動物であり、哺乳類で作出困難な、哺乳類間高度保存分子に対する抗体を作出するのに有用な免疫動物だからである。そのため、将来はニワトリ型モノクローナル抗体 (mAb) 活用の期待も高まっている。当研究室で確立されたニワトリハイブリドーマ作製技術は、プリオンタンパク質 (PrP) 等の哺乳類間で高度保存された分子に対して特異性が高く、バックグラウンドの低い優れたニワトリ mAb の作製を可能にした。しかし、樹立されたニワトリハイブリドーマの抗体産生能は、マウスハイブリドーマの抗体産生能と比較して低いという問題点を抱えている。この問題点を解決することは、ニワトリ型 mAb の大量調製を可能にし、同抗体の汎用性拡大に繋がるものと考えられる。マウスでは、IL-6 がマウスハイブリドーマの細胞増殖や抗体産生の促進に作用することが知られており、ハイブリドーマの培養系に有用な因子として利用されている。

そこで本研究では、ニワトリハイブリドーマ培養系にニワトリ IL-6 (chIL-6) を活用することを目的として、はじめに組み換え chIL-6 (rchIL-6) を作製し、ニワトリハイブリドーマ HUC2-13 に対する生物活性試験を実施し、同細胞株に対する有効性を検討した。続いて、chIL-6R のクローニングし、特に HUC2-13 に注目して種々のニワトリ組織および細胞株における発現を解析した。最後に、chIL-6R のニワトリハイブリドーマ培養系への活用法の一つとして、chIL-6R と chIL-6 の融合タンパク質 Hyper-chIL-6 (H-chIL-6) を作製し、HUC2-13 培養系に対して chIL-6 単独添加条件との STAT3 のリン酸化および抗体産生効果を比較すると共に、chIL-6 または H-chIL-6 添加、非添加時における HUC2-13 抗体遺伝子および抗体遺伝子の発現を制御していると考えられる遺伝子の発現を解析した。

第2章 ニワトリハイブリドーマに対する組み換えニワトリ IL-6 の有効性の検討

はじめに, rchIL-6 は原核型 (大腸菌発現) および真核型 (動物細胞) の 2 種類を作製し, IL-6 依存性マウスハイブリドーマ MH60 および抗ヒト PrP mAb 産生ニワトリハイブリドーマ HUC2-13 に対して細胞増殖促進効果を試験した. その結果, 両rchIL-6 は, 濃度依存的に MH60 の細胞増殖を促進したが, HUC2-13 に対しては効果を示さなかった. しかし, rchIL-6 添加により, IL-6 のシグナル伝達分子である STAT3 のリン酸化がマウス, ニワトリ両ハイブリドーマで観察されたことから, HUC2-13 が chIL-6 に対して応答性を示す, つまり細胞表面に IL-6R を発現していることがわかり, 同細胞株に対して細胞増殖効果とは異なる生物活性が発揮される可能性が考えられた. そこで, rchIL-6 添加, 非添加条件の HUC2-13 培養上清中の抗体量を測定したところ, rchIL-6 濃度依存的に上清中の抗体量が増加していることがわかり, chIL-6 添加による STAT3 のリン酸化が HUC2-13 の抗体産生能に影響を与えている可能性が示唆された. しかし, rchIL-6 同濃度添加条件下の HUC2-13 と MH60 を比較した場合, HUC2-13 のリン酸化 STAT3 量は MH60 と比べて少なかったことから, このリン酸化の違いは両ハイブリドーマにおける IL-6R の発現量に依存している可能性が考えられた. IL-6 シグナルの細胞内への伝達は, 特異的受容体 IL-6R と結合することが必須条件であることから, ニワトリハイブリドーマ培養系における rchIL-6 の活用を展開していくには, chIL-6R の解析をする必要があると考えられた.

第3章 ニワトリ IL-6 レセプターの解析

chIL-6R 完全長 cDNA は, ニワトリ肝細胞株 LMH 由来 cDNA を鋳型として 3' および 5' RACE 法によりクローニングした. クローニングした chIL-6R cDNA の全長はポリ A 配列を含めて 1857 bp であり, そこから予想されるアミノ酸は 445 アミノ酸であった. chIL-6R アミノ酸は, 20 残基のシグナル配列と, タイプ I サイトカインレセプターファミリーに特徴的なイムノグロブリン様ドメインおよびフィブロネクチン III 型 (FN III) ドメインが存在した. chIL-6R と哺乳類 IL-6R のアミノ酸レベルでの相同性は 40% であったが, FN III ドメインの N 末端側に 4 つのシステイン残基が, C 末端側に WSXWS モチーフが完全に保存されていたこと, ヒト IL-6R において IL-6 との結合に重要なアミノ酸が chIL-6R でも保存されていたことから, chIL-6R が IL-6R の特徴をよく保持していることがうかがえた. ニワトリの様々な細胞株由来 cDNA を用いて, IL-6R および gp130 mRNA の発現を解析したところ, ニワトリマクロファージ様細胞株 HD11, ニワトリ単球性白血病細胞株 IN24 および

LMH では IL-6R が強く発現していた。一方、ニワトリ細胞融合用親株 MuH1 およびニワトリハイブリドーマ HUC2-13 では、gp130 の高い発現は認められたものの、chIL-6R の発現は低いことがわかった。LMH と HUC2-13 に rchIL-6 を添加して、刺激培養後にリン酸化 STAT3 を検出したところ、LMH におけるリン酸化 STAT3 量は、rchIL-6 同濃度添加条件下の HUC2-13 よりも有意に多かったことから、rchIL-6 の標的細胞に対するシグナル量、つまりリン酸化する STAT3 量は、chIL-6R の発現量に依存していることが強く示唆された。IL-6R は、膜結合型と可溶型の 2 種類の存在が報告されているが、可溶型 IL-6R は膜結合型と同様、IL-6 と結合後、gp130 と複合体を形成してシグナルを伝達することが可能であることから、膜結合型 chIL-6R の発現量が少ない HUC2-13 の培養系に chIL-6 と可溶型 chIL-6R を共添加することで、chIL-6 のシグナルが強化されることが予想された。

第 4 章 ニワトリ IL-6 リセプターの HUC2-13 培養系への活用並びに IL-6 添加による HUC2-13 抗体産生機構の解析

近年哺乳類では、IL-6 と可溶型 IL-6R をリンカーで結合した融合タンパク質 Hyper-IL-6 (H-IL-6) が作製され、この H-IL-6 が gp130 陽性細胞に対してシグナルを伝達することが報告されている。本研究では、はじめに可溶型 chIL-6R のニワトリハイブリドーマ培養系への活用法の一つとして、chIL-6R と chIL-6 の融合タンパク質 (H-chIL-6) を作製し、同モル量の rchIL-6 添加条件とのリン酸化 STAT3 量を比較した。その結果、H-chIL-6 添加条件では chIL-6 添加条件に比べてリン酸化 STAT3 量が大きく増加していたことから、H-chIL-6 は chIL-6 に比べて強いシグナルを細胞内へ伝達することが示され、rchIL-6 よりも高い抗体産生促進効果を発揮することが予想された。しかし、H-chIL-6 添加条件では、予想に反して抗体量の増加は認められなかった。哺乳類では、IL-6 による抗体産生促進効果は、転写因子を介して転写レベルで制御されていることから、rchIL-6 添加と H-chIL-6 添加条件では STAT3 のリン酸化以降のシグナル伝達に違いが生じた可能性が考えられた。そこで、rchIL-6 または H-chIL-6 添加、非添加条件の HUC2-13 由来 cDNA を用いて、HUC2-13 抗体遺伝子およびその発現制御に関与すると思われる遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。その結果、rchIL-6 添加による STAT3 のリン酸化に伴い、転写因子 C/EBP β 、STAT シグナルのネガティブフィードバック因子 SOCS3 および抗体重鎖 (VH) 遺伝子の発現量が増加していた。また、各遺伝子の転写開始点上流域の DNA 塩基配列の決定および EMSA 試験から、リン酸化 STAT3 が C/EBP β および SOCS3 の発現を制御し、C/EBP β が VH の発現を制御していることが示唆された。これらの結果から、rchIL-6 添加による HUC2-13 抗体産生量の上昇は、リン酸化 STAT3 の増加に

よって C/EBP β の発現量が上昇し、その結果 VH の発現量が上昇することによりもたらされることが示唆された。それに対して、H-chIL-6 添加条件は、rchIL-6 添加条件に比べて C/EBP β および VH の発現上昇は認められなかった。その一方で、阻害因子である SOCS3 の発現は経時的に増加しており、H-chIL-6 添加により STAT3 のリン酸化がより強く誘導された結果、rchIL-6 添加時よりも「負の制御」が強く引き起こされた可能性が考えられた。

rchIL-6 添加による HUC2-13 抗体産生量の上昇において chIL-6 のシグナルは同時に SOCS3 の発現量を上昇させるものと思われ、培養時間の経過と共にリン酸化 STAT3 量の減少が観察された。このことから、chIL-6 は、HUC2-13 に対して一度だけ加えるのではなく、継続的に添加することで STAT3 のリン酸化がある程度持続され、結果としてより抗体産生促進効果が高まることが予想された。そこで、chIL-6 を培養 1 日毎に添加して、初日のみに添加した培養条件下の HUC2-13 抗体産生量と比較したところ、継続添加することで抗体量が増加傾向を示しており chIL-6 の継続添加がニワトリハイブリドーマの抗体産生能を増強させるのに有効であることが示された。

本研究では、ニワトリハイブリドーマの抗体産生能の改善を試みるために、chIL-6 に着目して試験した。その結果、chIL-6 は、STAT3 をリン酸化、C/EBP β の発現上昇を経て VH の発現量を上昇させ、HUC2-13 抗体産生量の上昇を誘導することが示された。また、chIL-6 を添加する際は、継続的に添加することが最も有効な活用法であることが示され、chIL-6 がニワトリハイブリドーマに対して有効な因子であることが示された。今後、C/EBP β 以外の抗体遺伝子の発現を制御する転写因子を同定することでニワトリハイブリドーマ抗体遺伝子の転写機構の解析が進み、これらの知見と chIL-6 を活用することで、ニワトリ mAb の大量調整にさらに寄与できると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始変わらぬご指導とご鞭撻を賜りました広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学研究室 松田治男教授、古澤修一教授ならびに堀内浩幸助手に心から感謝申し上げます。特に、昼夜を問わず、実験その他多々有用なご指導及びご助言を頂いた川嶋剛博士には心より感謝するとともに、厚くお礼申し上げます。また、本論文を作成するにあたり、貴重なご助言とご校閲を賜りました広島大学大学院生物圏科学研究科動物資源化学研究室 西村敏英教授に深く感謝いたします。

また、貴重な IL-6 依存性マウスハイブリドーマ MH60 をご分与いただきました大阪大学大学院生命機能研究科研究科長平野俊夫教授に厚くお礼申し上げます。

最後に常日頃暖かく励ましていただきました広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学研究室の皆様方並びに家族に深く感謝いたします。

参考文献

- [1] Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. and Hamuro, J. (1983) Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature (London)* 302: 305-310.
- [2] Paul, W. (1991) Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 177: 1859-1870.
- [3] Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, S., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T. and Kishimoto, T. (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature (London)* 324: 73-76.
- [4] Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. and Baumann, H. (1987) Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7251-7255.
- [5] Simpson, R. J., Moriyz, R. L., Rubira, M. R. and Van Snick, J. (1988) Murine hybridoma/plasmacytoma growth factor. Complete amino-acid sequence and relation to human interleukin-6. *Eur. J. Biochem.* 176: 187-197.
- [6] Zilberstein, A., Ruggieri, R., Korn, J. H. and Revel, M. (1986) Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.* 5: 2529-2537.
- [7] Haegeman, G., Content, J., Volckaert, G., Derynck, R., Tavernier, J. and Fiers, W. (1986) Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 15: 625-632.
- [8] Schneider, K., Klaas, R., Kaspers, B. and Staeheli, P. (2001) Chicken interleukin-6 cDNA structure and biological properties. *Eur. J. Biochem.* 268: 4200-4206.

- [9] Takai, Y., Wong, G. G., Clark, S. C., Burakoff, S. J. and Herrmann, S. H. (1988) B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 140: 508-512.
- [10] Ishibashi, T., Kimura, T., Uchida, T., Kariyone, S., Friese, P. and Burstein, S. A. (1989) Human interleukin-6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5953-5957.
- [11] Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Tran-Thi, T. A., Decker, K. and Heinrich, P. C. (1988) Regulation of synthesis and secretion of major rat acute-phase proteins by recombinant human interleukin-6 (BSF-2/IL-6) in hepatocyte primary cultures. *Eur. J. Biochem.* 173: 287-293.
- [12] Shabo, Y., Lotem, J., Rubinstein, M., Revel, M., Clark, S. C., Wolf, S. F., Kamen, R. and Sachs, L. (1988) The myeloid blood cell differentiation-inducing protein MGI-2A is interleukin-6. *Blood* 72: 2070-2073.
- [13] Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1988) Establishment of an interleukin 6 (IL-6)/B cellstimulatory factor 2-dependent cell line and preparation of anti-IL 6 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 18: 951-956.
- [14] Terada, S., Suzuki, E., Ueda, H. and Makishima, F. (1996) Cytokines involving gp130 in signal transduction suppressed growth of a mouse hybridoma cell line and enhanced its antibody production. *Cytokine* 8: 889-894.
- [15] Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, G., Tang, B., Sato, K., Shimizu, M., Maini, R., Feldman, M. and Kishimoto, T. (1988) Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 18: 1797-1801.
- [16] Horii, Y., Muraguchi, A., Iwano, M., Matsuda, T., Hirayama, T., Yamada, H., Fujii, Y., Dohi, K., Ishikawa, K., Ohmoto, Y., Yoshizaki, K., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1989) Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Immunol.* 143: 3949-3955.

- [17] Mitsuyama, K., Sata, M. and Tanikawa, K. (1991) Significance of interleukin-6 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Jpn.* 26: 20-28.
- [18] Yoshizaki, K., Matsuda, T., Nishimoto, N., Kuritani, T., Taeho, L., Aozasa, K., Nakahata, T., Kawai, H., Togo, H., Komori, T., Kishimoto, S., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1989) Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood* 74: 1360-1367.
- [19] Okazaki, M., Yamada, Y., Nishimoto, N., Yoshizaki, K. and Mihara, M. (2002) Characterization of anti-mouse interleukin-6 receptor antibody. *Immunol. Let.* 84: 231-240.
- [20] Grotzinger, J. (2002) Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1592: 215-223.
- [21] Bazan, J. F. (1990) Haematopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today* 11: 350-354.
- [22] Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1988) Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF2/IFN β 2) receptor. *Science (Washington, D. C.)* 241: 825-828.
- [23] Boulanger, M. J., Chow, D. C., Brevnova, E. E. and Garcia, K. C. (2003) Hexameric Structure and assembly of the Interleukin-6/IL-6 α -Receptor/gp130 complex. *Science (Washington, D. C.)* 300: 2101-2104.
- [24] Horiuchi, S., Koyanagi, Y., Zhou, Y., Miyamoto, H., Tanaka, Y., Waki, M., Matsumoto, A., Yamamoto, M. and Yamamoto, N. (1994) Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur. J. Immunol.* 24: 1945-1948.
- [25] Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. and Grave, L. (1998) IL-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334: 297-314.
- [26] Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N, Kishimoto, T. and Shinizu, A. (1997) Targeted disruption of the mouse STAT3 gene leads to early

embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3801-3804.

- [27] Abe, K., Hirai, M., Mizuno, K., Higashi, N., Sekimoto, T., Miki, T., Hirano, T. and Nakajima, K. (2001) The YXXQ motif in gp130 is crucial for STAT3 phosphorylation at Ser727 through an H7-sensitive kinase pathway. *Oncogene* 20: 3464-3474.
- [28] Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R. M., Hortner, M., Frienderichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A., Schneider-Mergener, J., Yoshimura, A., Neel, B. G., Heinrich, P. C. and Schaper, F. (2003) SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J. Biol. Chem.* 278: 661-671.
- [29] Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S. and Kishimoto, T. (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature (London)* 387: 924-929.
- [30] Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A. and Hilton, D. J. (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature (London)* 387: 917-921.
- [31] Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C. and Schaper, F. (2000) SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J. Biol. Chem.* 275: 12848-12856.
- [32] Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. and Shuai, K. (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science (Washington, D. C.)* 278: 1803-1805.
- [33] Okada, Y. (1958) The fusion of Ehrlich's tumor cell caused by HVJ virus *in vitro*. *Biken J.* 1: 103-110.
- [34] Kohler, J. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (London)* 256: 495-497.
- [35] Spieker-Polet, H., Sethupathi, P., Yam, P. C. and Knight, K. L. (1995) Rabbit monoclonal antibodies: Generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 92: 9348-9352.

- [36] Jensenius, J. C., Anderson, I., Hau, J., Crone, M. and Kock, C. (1981) Eggs: Conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods* 46: 63-68.
- [37] Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M. and Yamamoto, T. (1993) Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 450-454.
- [38] Hadge, D. and Ambrosius, H. (1984) Evolution of low molecular weight immunoglobulins of mammalian IgA. *Mol. Immunol.* 21:699-707.
- [39] Guss, B., Eliasson, M., Olsson, A., Uhlen, M., Frej, A. K., Jornvall, H., Flock, J. I. and Lindberg, M. (1986) Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *EMBO J.* 5: 1567-1575.
- [40] Larsson, A., Jonsson, L. and Sjoquist, J. (1988) Determination of circulating immune-complexes by chicken anti-human C3 and anti-human C1q micro ELISA. *J. Immunol. Methods* 113: 93-99.
- [41] Nishinaka, S., Akiba, H., Nakamura, M., Suzuki, K., Suzuki, T., Tsubokura, K., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H. (1996) Two chicken B cell lines resistant to ouabain for the production of chicken monoclonal antibodies. *J. Vet. Med. Sci.* 58: 1053-1056.
- [42] Prusiner, S. B., Scott, M. R., Dearmond, S. J. and Cohen, F. E. (1998) Prion protein biology. *Cell* 93: 337-348.
- [43] 中村尚登. (2003) プリオンタンパクを認識するパネル抗体に関する基礎および応用的研究. 広島大学大学院生物圏科学研究科博士論文.
- [44] Matsuda, H., Mitsuda, H., Nakamura, N., Furusawa, S., Mohri, S. and Kitamoto, T. (1999) A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23: 189-194.

- [45] Nakamura, N., Aoki, Y., Horiuchi, H., Furusawa, S., Yamanaka, H. I., Kitamoto, T. and Matsuda, H. (2000) Construction of recombinant monoclonal antibodies from a chicken hybridoma line secreting specific antibody. *Cytotechnology* 32: 191-198.
- [46] Nakamura, N., Shimokawa, M., Miyamoto, K., Hojyo, S., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H. (2003) Two expression vectors for the phage-displayed chicken monoclonal antibody. *J. Immunol. Methods* 280: 157-164.
- [47] Nakamura, N., Shuyama, A., Hojyo, S., Shimokawa, M., Miyamoto, K., Kawashima, T., Aosasa, M., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H. (2004) Establishment of a chicken monoclonal antibody panel against mammalian prion protein. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 807-814.
- [48] Asaoka, H. and Matsuda, H. (1994) Detection of N-glycolylneuraminic acid containing glycoproteins from various animal erythrocytes by chicken monoclonal antibody against Hanganutziu-Deicher antigens. *J. Vet. Med. Sci.* 56: 375-377.
- [49] 牧之段満. 哺乳類コラーゲンに対するニワトリモノクローナル抗体の作製. 広島大学生物生産学部卒業論文.
- [50] Winter, G. and Milstein, C. (1991) Man-made antibodies. *Nature (London)* 349: 293-299.
- [51] Berg, H., Kirchbach, A., Doderlein, G., Conscience, J. F. and Graf, T. (1979) Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes. *Cell* 18: 375-390.
- [52] Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1988) Establishment of an interleukin 6 (IL-6)/B cellstimulatory factor 2-dependent cell line and preparation of anti-IL 6 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 18: 951-956.
- [53] Shulman M, White CD, and Kohler G. (1978) A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276: 269-270.
- [54] Fukushima, T. and Shiota, T. (1974) Biosynthesis of biopterin by Chinese hamster ovary (CHO K1) cell culture. *J. Biol. Chem.* 25: 4445-4451.

[55] Kawashima, T., Amano, N., Koike, H., Makino, S., Higuchi, S., Kawashima-Ohya, Y., Watanabe, K., Yamazaki, M., Kanehori, K., Kawamoto, T., Nunoshiba, T., Yamamoto, Y., Aramaki, H., Makino, K. and Suzuki, M. (2000) Archaeal adaptation to higher temperatures revealed by genomic sequence of *Thermoplasma volcanium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14257-14262.

[56] Nissen, E., Pauli, G. and Vollenbroich, D. (1997) WST-1 assay-a simple colorimetric method for virus titration. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 33: 28-29.

[57] Nishinaka, S., Suzuki, T., Matsuda, H. and Murata, M. (1991) A new cell line for the production of chicken monoclonal antibody by hybridoma technology. *J. Immunol. Methods* 139: 217-222.

[58] Harris, J. F., Hawley, R. G., Hawley, T. S. and Crawford-Sharpe, G. C. (1992) Increased frequency of both total and specific monoclonal antibody producing hybridomas using a fusion partner that constitutively expresses recombinant IL-6. *J. Immunol. Method* 148: 199-207.

[59] Samad, F., Bergtrom, G., Eissa, H. and Amrani, D. L. (1993) Stimulation of chick hepatocyte fibronectin production by fibroblast-conditioned medium is due to interleukin-6. *Biochemica. et Biophysica. Acta.* 1181: 207-13.

[60]林義明. (1996) ニワトリハイブリドーマ増殖因子/インターロイキン 6 の分子生物学的解析. 広島大学大学院生物圏科学研究科修士論文.

[61]青笹正義. (1998) ニワトリ胚由来細胞増殖因子に関する研究. 広島大学大学院生物圏科学研究科修士論文.

[62]西道教尚. (2000) ニワトリハイブリドーマ増殖因子の探索に関する研究. 広島大学生物生産学部卒業論文.

[63]西道教尚. (2002) ニワトリハイブリドーマ増殖因子に関する研究. 広島大学大学院生物圏科学研究科修士論文.

[64] Horiuchi, H., Tategaki, A., Yamashita, Y., Hisamatsu, H., Ogawa, M., Noguchi, T.,

Aosasa, M., Kawashima, T., Akita, S., Nishimichi, N., Mitsui, N., Furusawa, S. and Matsuda, H. (2004) Chicken leukemia inhibitory factor maintains chicken embryonic stem cells in the undifferentiated state. *J. Biol. Chem.* 279: 24514-24520.

[65] Ogawa, H. and Fujiwara, T. (1987) Establishment and characterization of a virus-free chick cell line. *Acta. Med. Okayama* 44: 123-128.

[66] Fukada, T., Yoshida, Y., Nishida, K., Ohtani, T., Shirogane, T., Hibi, M. and Hirano, T. (1999) Signaling through gp130: toward a general scenario of cytokine action. *Growth Factors* 17: 81-91.

[67] Alessi, D. R., Saito, Y., Campbell, D. G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C. J. and Cowley, S. (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.* 13: 1610-1619.

[68] Raynal, M. C., Liu, Z., Hirano, T., Mayer, L., Kishimoto, T. and Chen-Kiang, S. (1989) Interleukin-6 induces secretion of IgG1 by coordinated transcriptional activation and differential mRNA accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8024-8028.

[69] Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. and Kishimoto, T. (1990) Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63: 1149-1157.

[70] Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G. and Schaper, F. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem. J.* 374: 1-20.

[71] 井上武. (2001) ニワトリ gp130 を介したニワトリサイトカインの探索に関する研究.

[72] Nishimichi, N., Aosasa, M., Kawashima, T., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Mastuda, H. Biological activity of recombinant chicken interleukin-6 in chicken hybridoma cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (in press)

[73] Berg, H., Kirchbach, A., Doderlein, G., Conscience, J. F. and Graf, T. (1979) Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display

three distinct phenotypes. *Cell* 18: 375-390.

[74] Kawaguchi, T., Nomura, K., Hirayama, Y. and Kitagawa, T. (1987) Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res.* 47: 4460-4464.

[75] Nakamura, N., Miyamoto, K., Shimokawa, M., Nishida, N., Mohri, S., Kitamoto, T., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H. (2003) Generation of antibodies against prion protein by scrapie-infected cell immunization of PrP0/0 mice. *Hybrido. Hybridomics* 22: 263-266.

[76] Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 24: 4876-4882.

[77] Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10: 1-6.

[78] Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. and Ponting, C. P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5857-5864.

[79] Letunic, I., Goodstadt, L., Dickens, N. J., Doerker, T., Schultz, J., Mott, R., Ciccarelli, F., Copley, R. R., Ponting, C. P. and Bork, P. (2002) Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucl. Acids Res.* 30: 242-244.

[80] Okayama, H. and Berg, P. (1981) High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.* 2: 161-170.

[81] Baldi, P. and Chauvin, Y. (1995) Protein modeling with hybrid Hidden Markov Model/neural network architectures. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 3: 39-47.

[82] Kalai, M., Montero-Julian, F. A., Grotzinger, J., Fontaine, V., Vandebussche, P., Deschuyteneer, R., Wollmer, A., Brailly, H. and Content, J. (1997) Analysis of the human

interleukin-6/human interleukin-6 receptor binding interface at the amino acid level: proposed mechanism of interaction. *Blood* 89: 1319-1333.

[83] Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T. and Kishimoto, T. (1993) Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *EMBO J.* 12: 1705-1712.

[84] Seed, B. and Aruffo, A. (1987) Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3365-3369.

[85] Sugita, T., Totsuka, T., Saito, M., Yamasaki, K., Taga, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1990) Functional murine interleukin-6 receptor with the intracisternal A particle gene product. *J. Exp. Med.* 171: 2001-2009.

[86] Leuders, K. K. and Kuff, E. L. (1980) Intracisternal A-particle genes: identification in the genome of *Mus musculus* and comparison of multiple isolates from a mouse gene library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3571-3575.

[87] Kuff, E. L., Feenstra, A., Lueders, K., Smith, L., Hawley, R., Hozumi, N. and Shulman, M. (1983) Intracisternal A-particle genes as movable elements in the mouse genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1992-1996.

[88] Vollmer, P., Oppmann, B., Voltz, N., Fischer, M. and Rose-John, S. (1999) A role for the immunoglobulin-like domain of the human interleukin-6 receptor (intracellular protein transport and shedding). *Eur. J. Biochem.* 263: 438-446.

[89] Grotzinger, J. (2002) Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1592: 215-223.

[90] Schwantner, A., Dingley, A. J., Ozbek, S., Rose-John, S. and Grotzinger, J. (2004) Direct determination of the interleukin-6 binding epitope of the interleukin-6 receptor by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 279: 571-576.

- [91] Eisenberg, S. P., Evans, R. J., Arend, W. P., Verderber, E., Brewer, M. T., Hannum C. H. and Thompson, R. C. (1990) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 343: 341-346.
- [92] Gabay, C., Silacci, P., Genin, B., Mentha, G., Le Coultre, C. and Guerne, P. A. (1995) Soluble interleukin-6 receptor strongly increases the production of acute-phase protein by hepatoma cells but exerts minimal changes on human primary hepatocytes. *Eur. J. Immunol.* 25: 2378-2383.
- [93] Kawashima, T., Hojyo, S., Nishimichi, N., Sato, M., Aosasa, M., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H. (2005) Characterization and expression analysis of the chicken interleukin-11 receptor alpha chain. *Develop. Comp. Immunol.* 29: 349-359.
- [94] Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J. and Wollmer, A. (1997) Grotzinger J, Rose-John S. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat. Biotechnol.* 15: 142-145.
- [95] Peters, M., Blinn, G., Solem, F., Fischer, M., Meyer, zum., Buschenfelde, K. H. and Rose-John, S. (1998) In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J. Immunol.* 161: 3575-3581.
- [96] Rackmann, T., Niehof, M., Kubicka, S., Fischer, M., Manns, M. P., Rose-John, S. and Trautwein C. (1999) The designer cytokine Hyper-interleukin-6 is a potent activator of STAT3-dependent gene transcription *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 274: 1257-1266.
- [97] Gotze, K. S., Kellar, U., Rose-John, S. and Peschel, C. (2001) gp130-stimulating designer cytokine Hper-interleukin-6 synergizes with murine stroma for long-term survival of primitive human hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematl.* 29: 822-832.
- [98] Akira, S. and Kishimoto, T. (1992) IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection. *Immunol. Rev.* 127: 25-50.
- [99] Cooper, C., Berrier, A., Roman, C. and Calame, K. (1994) Limited expression of C/EBP family proteins during B lymphocyte development. Negative regulator Ig/EBP predominates early and activator NF-IL-6 is induced later. *J. Immunol.* 153: 5049-5058.

- [100] Cooper, C., Henderson, A., Artandi, S., Avitahl, N. and Calame, K. (1995) Ig/EBP (C/EBP γ) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators. *Nucleic Acids Res.* 23: 4371-4377.
- [101] Lee, Y. K., Brewer, J. W., Hellman, R. and Hendershot, L. M. (1999) BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Mol. Biol. Cell* 10: 2209-2219.
- [102] Cormack, B. P., Valdivia, R. H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38.
- [103] Katz, S., Kowenz-Leutz, E., Muller, C., Meese, K., Ness, S. A. and Leutz, A. (1993) The NF-M transcription factor is related to C/EBP β and plays a role in signal transduction, differentiation and leukemogenesis of avian myelomonocytic cells. *EMBO J.* 12: 1321-1332.
- [104] Baglia, L. A., Bowers, W. J. and Ruddell, A. (1997) The avian C/EBP γ gene encodes a highly conserved leucine zipper transcription factor. *Gene* 190: 297-302.
- [105] Stoeckle, M. Y., Sugano, S., Hampe, A., Vashistha, A., Pellman, D. and Hanafusa, H. (1988) 78-kilodalton glucose-regulated protein is induced in Rous sarcoma virus-transformed cells independently of glucose deprivation. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2675-2680.
- [106] Domdey, H., Wiebauer, K., Klapthor, H. and Arnold, H. H. (1983) Sequence analysis of the cloned mRNA coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from chicken heart muscle. *Eur. J. Biochem.* 131: 129-135.
- [107] Reynaud, C. A., Dahan, A., Anquez, V. and Weill, J. C. (1989) Somatic hyperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* 59: 171-183.
- [108] Heinemeyer, T., Chen, X., Karas, H., Kel, A. E., Kel, O. V., Liebich, I., Meinhardt, T., Reuter, I., Schacherer, F. and Wingender, E. (1999) Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 27: 318-322.

- [109] 房木ノエミ. (2003) トランスフェクション法, III) エレクトロポレーション法. 新遺伝子工学ハンドブック改訂版第4版. 163-165.
- [110] Lipp, J., Dobberstein, B. and Haeuptle, M. T. (1987) Signal recognition particle arrests elongation of nascent secretory and membrane proteins at multiple sites in a transient manner. *J. Biol. Chem.* 262: 1680-1684.
- [111] Hatada, E. N., Chen-Kiang, S. and Scheidereit, C. (2000) Interaction and functional interference of C/EBP β with octamer factors in immunoglobulin gene transcription. *Eur. J. Immunol.* 30: 174-184.
- [112] Reynaud, C. A., Anquez, V., Grimal, H. and Weill, J. C. (1987) A hypermutation mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 48: 379-388.
- [113] Bolland, D. J., Wood, A. L., Johnston, C. M., Bunting, S. F., Morgan, G., Chakalova, L., Fraser, P. J. and Corcoran, A. E. (2004) Antisense intergenic transcription in V (D) J recombination. *Nature immunology (London)* 5: 630-637.
- [114] Dreyfus, M., Doyen, N. and Rougeon, F. (1987) The conserved decanucleotide from the immunoglobulin heavy chain promoter induces a very high transcriptional activity in B-cells when introduced into an heterologous promoter. *EMBO J.* 6: 1685-1690.
- [115] Mason, J. O., Williams, G. T. and Neuberger, M. S. (1985) Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell* 41: 479-487.
- [116] Poellinger, L., Yoza, B. K. and Roeder, R. G. (1989) Functional cooperativity between protein molecules bound at two distinct sequence elements of the immunoglobulin heavy-chain promoter. *Nature (London)* 337: 573-576.
- [117] Tanaka, M. and Herr, W. (1990) Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2: interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation. *Cell* 60: 375-386.
- [118] Strubin, M., Newell, J. W. and Matthias, P. (1995) OBF-1, a novel B cell-specific

cofactor that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding proteins. *Cell* 80: 497-506.

[119] Gstaiger, M., Knoepfel, L., Georgiev, O., Schaffner, W. and Hovens, C. M. (1995) A B-cell coactivator of octamer-binding transcription factors. *Nature (London)* 373: 360-362.