センダイウイルス (HVJ) による細胞融合*

その細胞工学, 細胞膜研究への応用

目加田 英 輔**

大阪大学微生物病研究所 〒565 吹田市山田上

センダイウイルス (HVJ) による細胞融合のメカニズムと, 融合現象の細胞研究への応用例について紹介した。

1. はじめに
2. HVJ による細胞融合のメカニズム
3. 融合に伴う細胞膜の変化
4. 融合細胞を用いての細胞膜研究
5. 細胞内物質導入への応用
6. おわりに

1. はじめに

HVJ (別名センダイウイルス) が細胞融合をきわめて高頻度に引き起こすという岡田の発見以来¹⁾, HVJ による細胞融合法は数多くの研究に盛んに用いられている。特に, 雑種細胞の形成と, それによる培養細胞の遺伝学的解析 (体細胞遺伝学) は, 細胞融合法の上に始めて成り立つものである。しかし, HVJ の持つ細胞融合能は細胞膜の性質を調べるために, あるいは細胞工学的研究にもきわめて有用である。ここでは, HVJ による融合のメカニズムについて簡単に述べた後, 細胞融合現象の細胞研究への新たな応用について紹介する。

2. HVJ による細胞融合のメカニズム

2.1 細胞融合についての考え方

水にリン脂質を加えて, ボルテックスミキサーや超音波で攪拌すると, 単層あるいは多層の脂質膜に囲まれた小胞 (liposome) ができる。このようにして作られた小胞は, 時にはそのまま放置しているだけで, あるいは Ca^{2+} や DMSO (ジメチルスルオキシド) を加えることで, 相互に融合する。動物細胞の細胞膜も脂質二重層を形成しているが, liposome ほど簡単には融合しない。これは脂質以外にタンパク質や糖質が細胞膜に組み込まれていて, これらが脂質層相互の接触を妨げているから

であると考えられる。さらに, 最近の細胞膜に関する知見によれば, 膜内タンパク質は脂質層内を自由に浮遊しているのではなく, 細胞内の「裏打ちタンパク」と密接に関連していて, これらによって膜内タンパクの動きは制限を加えられているらしい。これらのことから, 実際の細胞で融合が起こるためには, 何段階かの複雑な反応が必要であると考えられる。

HVJ 以外にも細胞融合を引き起こす物質やウイルスが知られているが, 融合を起こす効率の高さや, 細胞に対する毒性の低さの点では他の及ぶところではない。このため, HVJ は細胞融合に広く用いられている。しかし, HVJ のリセプターを持たない細胞 (例えば植物のプロトプラスト) を融合させることはできない。この場合にはポリエチレングリコール等がよく用いられているが, ここでは話題を HVJ による細胞融合に限定して紹介した。

2.2 HVJ の構造と構成成分

HVJ は, パラミキソウイルスに属する RNA 型のウイルスで, 直径 150~600 nm, 最外部に外膜 (envelop) を持つ大型のウイルスである (Fig. 1)。このウイルスを, 還元剤の存在下で, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べると, 6 種類のポリペプチドに分離する (Table 1)。このうち, HANA, F_1 , F_2 と呼ばれるものはいずれも糖タンパク質で, エンベロープに存在し, それぞれ独立にスパイクを形成する²⁾。そして後に述べるように, 融合反応に重要な役割を果たしている。NP は RNA と結合して, RNA-タンパク複合体 (ヌクレオキャプシド) を作っているものである。P はウイルス RNA を転写す

* Cell Fusion with Sendai Virus

** Eisuke Mekada: Department of Animal Virology, Research Institute for Microbial Descases, Osaka University, Suita, Osaka 565

Fig. 1 HVJ を構成成分からみた模式図

Table 1 HVJ の構成タンパク

名称	分子量	性 質
P	75,000	RNA ポリメラーゼ
HANA	67,000	赤血球凝集能, ノイラミニダーゼ活性を担う糖タンパク
NP	60,000	ヌクレオキャプシド構成タンパク
F ₁	50,000	F ₂ と -S-S- 結合していて, 融合反応に重要な役割を果たす糖タンパク
M	35,000	ウイルスの裏打ちタンパク (?)
F ₂	15,000	

る酵素である。Mタンパクはウイルス内部に存在し、ウイルス粒子の形成に関係すると考えられているが、その機能については不明である。

2.3 HANA タンパク, F タンパクの役割

HVJ はその生物活性として、赤血球凝集能 (HA 活性), ノイラミニダーゼ活性 (NA 活性), 溶血能, 細胞融合能を持つ。このうち, HANA タンパクは HA 活性, NA 活性を担い³⁻⁵⁾, 一方 F タンパク (F₁+F₂) は溶血能や細胞融合能に重要な役割を果たしている⁶⁻⁸⁾。

例えば, Portner らは⁵⁾, HVJ の温度感受性変異株を分離している。この変異株は, 非許容温度で HANA スパイクを持たないウイルスを生成するが, このウイルス粒子は, HA 活性, NA 活性を持たない。これらのことは, HANA タンパクが上記の活性を担うものであることを示す。さらに, このウイルスは細胞融合能も持たないので, 融合反応に HANA タンパクが必須であると考えられる。

F タンパクが融合反応に重要な役割を果たすことは別の実験から明らかにされている。HVJ は普通ふ化鶏卵で殖やされ, こうして得られたウイルスは HA 活性, NA 活性, 溶血能および細胞融合能を持つ。しかし, L 細胞や HeLa 細胞などの培養細胞で増殖した HVJ では, HA, NA 活性は持つが, 溶血能, 細胞融合能を持たない

し, このウイルスは続いて培養細胞に感染することができない。本間は, この非活性型 HVJ にきわめて弱くトリプシンを作用させると, 溶血能, 融合能, 感染能を持った活性型ウイルスに変換することを見出した⁶⁾。そして, 非活性型 HVJ のトリプシン処理前後での SDS ゲル電気泳動のパターンを比較したところ, F のバンドに違いがあった⁹⁾。すなわち, 非活性型では, F タンパクは分子量 66,000~68,000 の 1 本のバンドとして現われるが, 活性型では F₁ (分子量約 51,000) と F₂ (分子量約 15,000) の 2 本のバンドに別れている。このトリプシン処理では, 他のバンドに全く影響を与えないことから, F の F₁+F₂ への解裂が活性型への転換の原因になっているとともに, F タンパクが細胞融合能, 溶血能, 細胞への感染性に必要であることが明らかとなった。

2.4 ウィルスエンベロープの再構成

HVJ を表面活性剤で処理すると, エンベロープが溶かされ, 溶血能, 細胞融合能が失われる。これを透析によって表面活性剤を除くと, 主にエンベロープの構成成分からなる, 膜構造を持った小胞が再構成される。この再構成粒子は HA 活性, NA 活性, 溶血能, 細胞融合能を持つ⁷⁾。一方 HANA タンパクと F タンパクは, これまで部分的にしか精製されていなかったが, 最近可溶化剤存在下で Fetuin カラム¹⁰⁾やイオン交換カラム¹¹⁾にかける方法で, かなり純粋なものが得られるようになった。そこでこのようにして得られた F タンパク (F₁と F₂は通常-S-S-結合でつながっている) と HANA タンパクに, 別に精製したリン脂質を加えて膜構造を再構成する実験がなされた¹⁰⁻¹²⁾。その結果によれば, HANA タンパクだけからなる再構成粒子は HA 活性, NA 活性を示すが, 溶血能, 融合能を持たず, F タンパクだけからなる粒子は特別な活性を持たなかった。しかし F タンパクと HANA タンパクの両者を加えたものは, 溶血能, 融合能を持っていた。また, 小沢らの実験系では¹²⁾, 再構成粒子の細胞融合能は, 加えられた脂質の組成と量によって変化することが示された。以上の事実は, HVJ が細胞融合能を持つためには, 少なくとも F タンパクと HANA タンパクが必要であり, しかもこれらが脂質層に埋まって一定の膜構造を取っていないと示しているものと思われる。

2.5 エンベロープ融合と細胞融合

細胞浮遊液に HVJ を加えて, 37°C でインキュベーションすると細胞は相互に融合するが, 同時にウイルス外膜と細胞の融合も起こる。これを前者の細胞融合と区別して, エンベロープ融合という。HVJ が細胞に感染

する際には、エンベロープ融合によって核酸を細胞内に放出するものと考えられている。

エンベロープ融合と細胞融合は、通常同時進行的に進み、細胞融合はエンベロープ融合があって始めて起こり得る現象であることはこれまでの実験からも明らかである。しかしある条件下では、この二つは区別して観察できる。エールリッヒ腹水癌細胞の場合、細胞融合は呼吸阻害剤¹³⁾や EDTA¹⁴⁾の存在によっておさえられる。またマイクロフィラメント系阻害剤であるサイトカラシン D¹⁵⁾や高濃度の糖¹⁶⁾(マンノース、グルコース、シュクロース、etc)も細胞融合をおさえる。ところが、これらの条件下でエンベロープ融合はほとんど影響を受けない¹⁵⁾。赤血球ゴーストを用いた系では¹⁷⁾、ゴーストに抗スペクトリン抗体を作用させると、エンベロープ融合は起こるが細胞融合は起こらない。これらの現象を説明するためには、細胞融合はウイルスエンベロープの細胞膜への融合によって細胞側になんらかの反応が引き起こされ、その結果始めて起こるものと解釈すると都合が良い。

2.6 細胞融合のメカニズム

どうやら HVJ による細胞融合のメカニズムは、ウイルスが二つの細胞の間の橋わたしとなって起こるような単純なものではなさそうである。現在の段階で正確な融合メカニズムを論じることが不可能であるが、以下に岡田によって提唱されているモデル¹⁸⁾を簡単に紹介する。

Fig. 2 で見られるように、ウイルスエンベロープと細胞膜が融合を起こすと、このとき融合部位で局所的に細胞内の骨格構造(膜の裏打ちタンパク等)に変化が起こる。次にこの変化は周辺に及ぶ。これによって、今まで裏打ちタンパクによって移動を制限されていた膜内タンパクが膜内を自由に動くようになる。この結果、ウイル

ス融合部位の近くで、隣接する細胞間に細胞膜脂質二重層が直接露出して接する部分が現われ、ここが融合する。

細胞融合とエンベロープ融合が、ある条件下で分離できることはすでに述べたとおりである。この融合モデルは、それら一連の現象を説明するために非常に都合が良い。最近、細胞膜の裏打ちタンパク質に関して多くの仕事が行なわれつつあるので、このモデルもさらに具体的な形で検証、訂正されるものと思われる。

3. 融合に伴う細胞膜の変化

3.1 ノイラミニダーゼによる修飾

HVJ の属するパラミクソウイルスやインフルエンザウイルスは、その外膜にノイラミニダーゼ(NA)を持つ。HVJ では HANA タンパクがこの活性を担っている。これらウイルス NA の役割はよくわかっていない。HVJ の場合には、融合反応において細胞表面からのシアル酸の除去が、細胞間の電的反発力を弱めて、細胞同士をより接触しやすくし、融合を促進する可能性が考えられている。

それはともかく、融合反応に伴って細胞から実際にシアル酸が遊離される。このとき遊離されるシアル酸量は、エールリッヒ腹水癌細胞の場合、全シアル酸の15~40%である。このような糖鎖からのシアル酸除去が細胞膜の機能にどのような影響を与えるであろうか? 近年著者らは、HVJ 処理の前後で、細胞の細菌毒素に対する感受性がどのように変化するかを調べた¹⁹⁾。この結果、HVJ 処理はジフテリア毒素、リシン毒素に対する感受性を増加し、これは HVJ の NA 活性によるものであることを明らかにした。また、興味あることに *Pseudomonas aeruginosa* の exotoxin A に対する感受性は、バク

Fig. 2 HVJ による細胞融合のモデル (Okada, Y., 1979¹⁸⁾より改図)

テリア由来の NA で増加されるにもかかわらず、HVJ の NA では無効であった。NA 処理が細胞にどのような影響を与えてこのような結果になるのか詳しいことは今後の問題であるが、この系から細胞膜に存在するシアル酸の役割がわかってくる可能性も考えられる。

3.2 ウイルス抗原の細胞膜への移植

HVJ が細胞とエンベロープ融合を起こすと、ウイルス外膜の成分は細胞膜上に移しかえられる。細胞にとってウイルス外膜成分は明らかに異物であるが、これに対して細胞はどのように対応するであろうか？ このような観点から、エンベロープ融合した細胞を調べることは、細胞膜の機能を知る上で重要である。

これまでに、細胞膜に移植された HVJ 外膜タンパクの運命が調べられている。HVJ の持つ生物活性は、エンベロープ融合直後にはまだ細胞膜上で保たれている¹⁶⁾。なぜなら、この細胞は赤血球をよく吸着し (HA 活性)、未処理の細胞と混ぜ合わせると融合を起こす。ところが、この細胞を 37°C で培養すると、これらの活性は時間とともに減少し、約 4 時間で完全に消失する。この過程は、HVJ 糖タンパクに対する抗体を用いるとさらに詳しく調べることができる。融合直後の細胞を蛍光抗体法で観察すると、蛍光は細胞の輪郭に沿ってリング状に見出される²⁰⁾。これをフェリチン抗体法によって電顕的に観察すると、ウイルス抗原は細胞膜上でパッチ状に存在する²¹⁾。37°C で培養を続けると、ウイルス抗原は coated pit と呼ばれる部分から細胞内に陥入を始め、coated vesicle と呼ばれる特別の構造を持った小胞を形成して²²⁾、細胞内部に取り込まれてゆく。エールリッヒ腹水癌細胞では、この後、細胞膜の一部が突出してくる。そしてここにウイルス抗原が集積していることが観察される^{20, 21)}。さらに培養すると、ウイルス抗原は観察されなくなる。

このような HVJ 外膜抗原のダイナミックな動きは、おそらく細胞が細胞膜に組み込まれた異物を排除するために行っているものと思われる。金に万らは、このとき形成される coated vesicle に着目して、さらに研究を進めている。細胞膜上のタンパクのターンオーバーを調べる系として今後が楽しみである。

3.3 細胞膜物質透過性の増大

融合反応時に、膜電位の低下することが知られている²³⁾。細胞内に微小ガラス電極を挿入して、膜内外の電位を測定すると、HVJ を加えた細胞では融合反応初期に膜電位の低下が観察される。通常融合反応は、低温でウイルスと細胞を混ぜ合わせてウイルスを十分細胞に吸着させた後、37°C 約 30 分のインキュベーションで完了

される。膜電位の低下は、低温に置かれている間にすでに起こっている。温度を上げてゆくと、約 10 分で正常な膜電位を持つようになり、このころに融合細胞が顕微鏡下で観察されるようになる。このような膜電位の変化は、L 細胞で増殖させた HVJ では見られないので、融合反応に特異的なものであることがわかる。

驚くべきことに、融合反応時には分子量約 2 万のタンパク質までも透過する。この事実は、遺伝病細胞に酵素タンパクを導入する実験²⁴⁾によって明らかにされた。これについては 5 章で詳しく解説する。

4. 融合細胞を用いての細胞膜研究

Fryl と Edidine は²⁵⁾、マウス細胞とヒト細胞を融合させると、数 10 分の間に互いの膜抗原が混じり合うことを報告した。この動きは温度依存性で、4°C では起こらないが、エネルギー代謝やタンパク質合成の阻害剤で止めることはできない。この現象は細胞膜の流動モザイクモデルの重要な証拠として考えられてきた。現在では、膜内タンパク質が何の制限もなく膜上に浮遊しているとは考えられていないが、細胞融合を細胞膜研究に用いた一例である。

ペプチドホルモンやカテコールアミンが動物細胞膜に結合すると、アデニル酸シクラーゼが活性化されることはすでによく知られている。この時細胞によっては複数のホルモンによって同一の作用を受ける。たとえば、脂肪細胞では TSH, ACTH, グルカゴン, アドレナリン, ノルアドレナリンに反応して、脂肪分解を促進する。Rodbell らはこれに関して、脂肪細胞ではそれぞれのホルモンに対応した多種のレセプターが細胞膜上に存在し、それが同一のアデニル酸シクラーゼを活性化するのであろうと主張した。そしてその後の研究から、細胞膜上のホルモンレセプターは少なくとも二つの独立した要素 (ホルモン結合部位とアデニル酸シクラーゼ) によって構成されていると考えられるようになってきた (現在では少なくとも 3 個の要素が存在するとされている)²⁷⁾。

Orly と Schramm²⁶⁾ は細胞融合法を用いて、上記の二つの要素が分離可能であることをあざやかに証明した。フレンド細胞 (Friend erythroleukemic cell, 略して Fe) にイソプロテレノールを作用させても、細胞内 c-AMP レベルはほとんど上昇しない。しかしフッ化ナトリウムには反応するので、アデニル酸シクラーゼを持つことは明らかである。一方、七面鳥の赤血球 (E) はイソプロテレノールに反応して cAMP を合成するが、この赤血球を NEM (N-エチルマレイミド) で処理するとアデニ

Fig. 3 赤血球カテコールアミンレセプターとフレンド細胞アデニル酸シクラーゼのカップリング (Orly, J., Schramm, M., 1976²⁶⁾ より)

I : NEM 処理された赤血球 (E_M) 同士を融合させたもの

II : フレンド細胞 (Fc) 同士を融合させたもの

III : Fc と E_M を融合させたもの

IV : Fc と E_M のミクスチャー

V : Fc のみ

VI : 未処理赤血球

B, ISO, F はそれぞれ基礎活性, イソプロテレノールを加えた時, フッ化ナトリウムを加えた時の活性を示している。

ル酸シクラーゼが不可逆的に失活してしまう。Fc と N- E_M で処理した E (E_M) を, HVJ を使って融合させると, 融合細胞はイソプロテレノールに反応するようになり, 細胞内 c-AMP の上昇が観察される (Fig. 3)。2種の細胞を単に混合培養した時や, イソプロテレノールに対するレセプターを持たないヒト赤血球を用いた時には, 融合による上記の相補作用は見られない。またイソプロテレノールによる活性化は融合後数分以内に起こり, これはタンパク合成阻害剤に影響されない。以上の事実から, 七面鳥赤血球にあるアドレナリン β -レセプターはフレンド細胞のアデニル酸シクラーゼと coupling が可能で, それによってホルモンレセプターとして機能を発揮するようになることがわかった。

細胞膜上の各種レセプターを構成する要素を調べるために, 上の実験で用いられたようなアプローチは有効である。とくに最近では, 各種膜タンパク質の可溶化と liposome への再構成が可能になってきたので, この系はレセプターを持たない細胞へレセプターを移植する実

験^{28, 29)}の方向へと発展するものと思う。

5. 細胞内物質導入への応用

生体高分子やその他の生物活性のある物質の細胞内での機能を知るためには, それらの物質をなんらかの手段で細胞内に入れてやるのがもっとも直接的な方法である。これまではキャピラリーによるマイクロインジェクションがこの目的に利用されてきた。実際にカエルの卵母細胞を用いた系では, これによって数々のすばらしい仕事が行なわれている^{30, 31)}。しかし培養細胞でこの方法を用いる時には, 種々の難点が生じる。培養細胞は卵細胞に比べるとはるかに小さいので, インジェクションに高度のテクニックを要すること, 一定時間に処理できる数が少ないこと, 定量的に物質を入れにくいことなどである。そこで培養細胞に応用できる新しい細胞内物質導入法の開発が望まれる。

HVJ とそれによる細胞融合現象が, 細胞内への物質導入の手段として利用できることがわかった。著者の属

する研究室では、近年このテーマに関してとくに精力的に仕事を進めてきて、数種類の方法を開発した。これらはいずれも HVJ を利用したものであるが、それぞれ違った特徴を持ち、目的によって使い分けられる。以下に、その各々の方法、その特徴、それによってなされた仕事について紹介する。

5.1 HVJ 処理による細胞膜の乱れを利用した方法

融合反応初期に、細胞膜が一時的に leaky になることはすでに 3. 章で述べた。この現象が細胞内物質導入に利用できる。ジフテリア毒素を例にとって紹介する³²⁾。

ジフテリア毒素は分子量 62,000 の単一ポリペプチドである。これを DTT (ジチオスレイトール) 存在下で、トリプシンで弱く処理すると、分子量約 2 万のフラグメント A と分子量約 4 万 2 千のフラグメント B に別れる。フラグメント A はタンパク合成に必要な EF2 を ADP-リボシル化する作用をもつ。この結果、細胞はタンパク合成が阻害されて、死んでしまう。フラグメント B は毒素感受性細胞の表面に結合して、フラグメント A を細胞内へ送り込む作用をもつ。通常フラグメント A だけを細胞培養液に加えても、これは細胞内に侵入することができないので、きわめて高濃度で加えない限り細胞は死ぬことはない。しかしなんらかの人為的方法で、フラグメント A を細胞内に入れてやると、細胞はこれによって死んでしまう^{33,34)}。

FL 細胞を、細胞同士が相互に接触しないような濃度でペトリ皿にまき、約 9 時間培養する。ペトリ皿に接着した細胞にフラグメント A と HVJ の混合液を重ねる。4°C で 20 分置いた後、37°C に上げて 15 分培養する。この後、フラグメント A を洗い流して、新しい培養液を加えて培養を続ける。数日後には、この処理で生き残った細胞はコロニーを作り、その数を数えることができる。

Fig. 4 からわかるように、フラグメント A と HVJ の両者を加えたものでは、両者の濃度に依存して、細胞が死んでいる。どちらか一方ではまったく効果がない³²⁾。フラグメント A の加える時間を変化させて、どの時期にフラグメント A が細胞内に入るかが調べられている。それによれば、フラグメント A の透過は低温時にはまったく見られず、37°C に上げた直後が著しく、37°C 15 分後でも見られた。この結果は、ガラス電極によって測定された膜電位の変化のそれとは必ずしも一致しないが、エンベロープ融合によって生じた一時的な細胞膜の乱れによって、タンパク質が細胞内に透過するものと解釈される。

簡単のために、ジフテリア毒素を用いた実験系で紹介

Fig. 4 HVJ 処理によるフラグメント A の細胞内透過 (Yamaizumi, *et al.*, 1979³²⁾ より)

図中で 2 μg, 20 μg, 80 μg の数字は加えたフラグメント A の濃度 (μg/ml) を表す。

したが、この方法が実際に開発され、応用されて威力を発揮したのは次の実験である。色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum, XP) と呼ばれる遺伝病がある。この患者から得た細胞 (XP cell) は紫外線に異常に敏感で、正常細胞では平気な範囲の照射量で死んでしまう。正常細胞は紫外線によって生じた DNA 鎖のピリミジンダイマーを除去修復する機構をもつが、XP cell ではこの機構に欠損があるらしい。田中らはここで示した方法を用いて、XP cell に T₄ フェージから得たエンドヌクレアーゼを導入することを試みた²⁴⁾。エンドヌクレアーゼを導入された XP cell は、紫外線によって生じた障害を正常細胞と同じ効率で見事に修復した。また、XP cell には相互に遺伝的相補性を示す 5 群が知られているが、このエンドヌクレアーゼはすべての群の細胞に効果があつた。これらのことから、5 群の XP cell はすべて、除去修復機構の中のエンドヌクレアーゼ欠損によるものであることが明らかにされたのである。またヒトでは、エンドヌクレアーゼに関して少なくとも 5 つの遺伝子の関与がわかった。

この方法の長所は、何といっても簡便なことである。処理されたどの細胞にも均一に物質が入ること、低分子物質にも応用できることも優れた点であるが、多量の物質を導入できないのが欠点である。

5.2 HVJ 自体を物質のキャリアーとして利用する方法³⁵⁾

HVJ はエンベロープウイルスであるので、HVJ を超音波で処理するとエンベロープに一時的に穴が開き、次に閉じる時に物質を包み込む可能性がある。もしこれを

Table 2 超音波処理によってフラグメントAを内部に取り込んだ HVJ の細胞毒性
(Uchida, *et al.*, 1979³⁵)より)

試 量	ペトリ皿に形成された細胞のコロニー数			
	HVJ の濃度 (HAU/ml)			
	5,000	1,700	500	170
フラグメントAを含む超音波処理 HVJ (0.13 μ g) ^{a)}	0	0	0	2
フラグメントAを含む超音波処理 HVJ (0.013 μ g) ^{b)}	1	8	28	63
フラグメントAを含まない超音波処理 HVJ	190	198	205	—
未処理 HVJ とフラグメントAのミクスチャー ^{c)}	—	218	211	—

L 細胞を、表に示したウイルス濃度 (HAU/ml) で処理した後、処理細胞の生死をコロニーの形成で調べている。

a): 5,000HA の HVJ あたり 0.13 μ g のフラグメント A を含む。

b): 5,000HA の HVJ あたり 0.013 μ g のフラグメント A を含む。

c): 5,000HA の HVJ あたり 1 μ g のフラグメント A を加えたもの。

細胞と融合させると、物質は細胞内に導入されるはずである。これを調べるために、またジフテリア毒素のフラグメントAが利用された。

HVJ とフラグメント A の混合液を超音波で処理した後、これをショ糖密度勾配中で遠心する。HVJ 粒子は遠心によって遠心管の底の方に移動する。管の底から一定量ずつ採取して、各フラクションに含まれるフラグメントの酵素活性を測定すると、HVJ 粒子が含まれるフラクションに一致して酵素活性のピークがあらわれる。このとき、表面活性剤 (NP40) を加えて HVJ 粒子を溶かした後に活性を測定すると、酵素活性は3倍以上増加した。また超音波処理をしない試量では、NP40の有無にかかわらず、HVJ の位置に活性が認められない。超音波処理によってフラグメントAは HVJ の中にトラップされたと判断できる。次に、このフラグメントAを含んだHVJで細胞を処理し、その毒性を調べた。Table 2に示したように、HVJ が効率よく細胞を殺していることがわかる。コントロール実験として未処理 HVJ とフラグメントAを同時に加えたものは、この程度の濃度で処理される限り致死効果はない。したがって、ここで見ている致死効果は HVJ によって細胞膜が leaky になったこと (1の方法) によるのではない。これはすなわち、この方法が1の方法より効率よく物質導入できることを示している。

5.3 HVJ スパイクを持つリボゾームによる方法³⁶⁾

表面活性剤で可溶化した脂質から、透析などの方法で活性剤を抜いていくと、リボゾームが形成される。このとき任意の物質を加えてリボゾームを形成させると、その物質をトラップしたリボゾームが生じる。細胞内物質導入にこのようなリボゾームを用いる試みはすでによく

報告されているが³⁷⁾、現実的にはあまり良い方法でない。なぜなら、リボゾームは細胞によく吸着するが、その多くは細胞と融合することなく細胞膜にそのまま残されるだけであるからだ³⁸⁾。ところで、HVJ のスパイクタンパクは膜融合を促進する活性をもつ^{10~12)}。内田らは、もしスパイクタンパクを膜表面に持つリボゾームを再構成できれば、それはきわめて効率よく物質を導入するであろうと考えた。

HVJ のスパイクタンパク、ジフテリア毒素フラグメントA、レシチン、コレステロールからなる混合液に

Fig. 5 HVJ スパイクを持つリボゾームのショ糖密度勾配中での沈降パターン (Uchida, *et al.*, 1979³⁶⁾より)

A. 抗スパイク抗体を加えないもの

B. 抗スパイク抗体を加えたもの

Table 3 フラグメント A を包み込み, HVJ のスパイクを持つリボゾームの細胞毒性
(Uchida, *et al.*, 1979³⁶)より改稿)

試 量	ペトリ皿あたりのコロニー数				
	(リボゾーム濃度) ^{a)} 100	30	10	3	1
フラグメント A を含む HVJ スパイクリボゾーム	0	0	0	1	4
フラグメント A を含むが HVJ スパイクを持たないリボゾーム	135	162	159	182	—
フラグメント A を含まない HVJ スパイクリボゾーム	169	185	—	—	—
フラグメント A	182	179	—	—	—

a) : リボゾーム濃度は HA 活性とフラグメント A の酵素活性を基準にして, 相対的な濃度で表わしてある。

NP40 を加えて, よく溶かす. NP40 を透析によって徐々に取り除くと, リボゾームが形成される. これを Bio-gel のカラムに通して, リボゾームにトラップされなかったフリーのフラグメント A を除く. Fig. 5-A は, このような方法で得られたリボゾームをショ糖密度勾配で遠心したときのプロファイルである. この条件では, 生成したリボゾームは遠心管のトップにきているが, それに一致してフラグメントの酵素活性のピークがくること, これを NP40 存在下で測定するとその酵素活性は著しく増加することが見てとれる. すなわちリボゾームは確かにフラグメント A をトラップしているのである.

このリボゾームがスパイクタンパクを表面にもっていることは, スパイクタンパクに対する抗体を用いて調べられている. すなわちこれをリボゾームに加えると著しく濁度が増加したが, この試量を前と同条件でショ糖密度勾配にかけると, リボゾームの位置が遠心管の下の方に移動した (Fig. 5-B). それと同時にフラグメント A の活性も移動した. もちろん, この移動は非特異的な抗体で処理したときには起こらない. また, このリボゾームを電子顕微鏡で観察した結果, HVJ のスパイク構造がリボゾームの内側と外側の両方に向かって伸びていることが確認されたのである.

そこで, このリボゾームで細胞を処理したときの毒性を示す. Table 3 でみられるように, HVJ スパイクを持つリボゾームは, 持たないものに比べてはるかに強い毒性を示す. すなわち, 物質導入に HVJ スパイクを持つリボゾームは有効であることがわかる.

この方法は, 5.1 や 5.2 の方法よりも多くの物質を細胞内に入れることができるが, それよりも次に述べるような展開が今後期待される点特徴的である. HVJ のスパイクは HANA タンパクと F タンパクによって構成されていて, このうち HANA タンパクが細胞凝集活性を担い, F タンパクが融合活性に関係していることは

すでに述べた. ここで示したリボゾームの系で, HANA タンパクを別のもの (特別な細胞だけを認識して結合するようなもの, 例えば特異的な抗体) に置き換えると, 特別な細胞にだけ物質を導入できる可能性がある. これにはまだ多くの問題を解決しなければならないと思われるが, 将来きわめて有望である.

5.4 赤血球ゴースト法

古沢, 山泉によって開発された方法で³⁹⁾, これまで紹介したものの中で最も多量の物質を導入できるものである. Fig. 6 に, その手順を模式的に示した. まず細胞内に入れたい物質を赤血球ゴーストに包みこんで, このゴーストを細胞と融合させるのである. 以下に各過程を順を追って解説する.

ヒト赤血球と細胞内に入れたい物質を透析バッグに入れて, 低張液で透析する. 透析後10分くらいで, 個々の赤血球はパンクしてヘモグロビンを放出するが, 赤血球膜はすぐに修復される. このときバッグに加えた物質は赤血球ゴースト内にトラップされる. 等張液にもどして約30分透析した後, ゴースト内にトラップされなかった物質を遠心によって除くと, 物質を包み込んだゴーストができあがる.

ゴースト内に 取り込まれた 物質 の安定性は, ¹²⁵I-BSA (BSA: 牛血清アルブミン) を用いて調べられている⁴⁰⁾. ゴースト内の¹²⁵I-BSAをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べたところ, ゴースト調製後約 24 時間放置 (4°C) したもののでも, BSA 分子のフラグメンテーションは観察されなかった. またゴーストから¹²⁵I-BSAがどの程度漏出するかが調べられている. それによれば, 4°C で保存される限り, 1 日後で数%, 4 日後で10%程度しか漏出しな. これらのことから, ゴースト内にトラップされた物質はきわめて安定で, それらはゴーストからほとんど漏れ出さないことが判る.

ゴースト内にトラップされる物質の量は, 透析バッグ

Fig. 6 赤血球 ゴースト法の概略図 (Furusawa, *et al.*, 1976⁵¹⁾ より改図)

- 透析チューブに注入したい物質と赤血球を入れる。
- チューブを低張液に透析する。この時、赤血球はパンクして、ヘモグロビンの一部は外へ、物質は血球の内部に入る。
- 再びチューブを等張液にもどして透析する。
- e) 細胞と a)~c) の操作でできあがった ghost を HVJ を使って融合させる。
- ghost 内の物質は細胞質内に入る。また赤血球膜抗原も、細胞膜の中に埋めこまれ、膜中を拡がる。

Fig. 7 透析バッグ内の ¹²⁵I-IgG 濃度を变化させたときに、赤血球ゴーストにトラップされる ¹²⁵I-IgG の濃度 (Yamaizumi, *et al.*, 1978⁴¹⁾ より改図)

に加えた物質の濃度に比例する (Fig. 7)⁴³⁾. Fig. 7 からわかるように、IgG の場合 (分子量約16万)、透析バッグに加えた物質の濃度の約30%の濃度でゴースト内にトラップされる。BSA (分子量6万) では50%、フラグメントA (分子量2万) では100%の濃度でトラップされる。この比例関係は、透析バッグ内の物質濃度が少なくとも5 mg/ml までは成立する。個々のゴーストで、取り込まれる物質量にどの程度の差があるのかも調べられている⁴³⁾. この実験は FITC (フルオレッセインイソチオシアナート) でラベルした BSA をゴーストに取り込ませ、個々のゴーストの持つ蛍光強度を FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) で測定して行なわれたが、ゴーストのもつ蛍光物質の量はきわめて均一な分布を示した。これらの事実は、透析バッグ内の物質濃度を変えることで、ある一定量の物質を含むゴーストを作り得ることを意味する。物質をトラップしたゴーストが細胞と融合すると、物質は直ちに細胞内に拡がっていく。FITC-BSA を用いて蛍光顕微鏡下で観察すると、FITC-

BSA は融合と同時に細胞質に注入され、数分以内に細胞質全体に行渡る。ただし、BSA は核内には移行できないらしく、核だけ黒く抜けて観察される。

ゴースト法を用いて細胞内に導入された物質としては、t-RNA^{44,45)}、BSA^{46,43)}、IgG^{41,47)}、thymidine kinase⁴⁸⁾、ジフテリア毒素フラグメント A⁴²⁾、ノンヒストン核タンパク⁴⁹⁾、他がある。これらの物質はいずれも細胞内で機能を示し、多くの興味ある結果が報告されているが、ここでは省略する。

ゴースト法の特徴として、定量的に物質を導入できることがある。すでに示したようにゴーストにトラップされる物質の量は、ある範囲内で任意に加減することが可能である。そこでゴーストと細胞を融合させたとき、一定の個数のゴーストと融合した細胞だけを集めることができるならば、その細胞はすべて等量の物質を含むはずである。著者らはこの目的のために FACS という装置で細胞を分けることを試みた。この装置は、個々の細胞のサイズと、蛍光を測定する⁵⁰⁾。そして、使用者が指定した一定のサイズと蛍光をもつ細胞だけを集める機能をもつ。FITC-BSA をトラップしたゴーストを細胞に融合させ、FACS にかけて細胞のもつ蛍光量を測定した (Fig. 8)。

Fig. 8 FITC-BSA を含むゴーストと融合したL細胞の蛍光分布図 (Mekada, *et al.*, 1979⁴³⁾より)

融合細胞を FACS にかけて時の蛍光のプロフィール。4つの Peak はそれぞれ0～3個のゴーストと融合した細胞である。

その結果、細胞のもつ蛍光量の違いから、0～3個のゴーストと融合した細胞群を、それぞれ別に集め得ることがわかったので、定量的導入が一応可能となった⁴³⁾。そこで次の実験を行った。FITC-BSA とジフテリア毒素の包み込まれたゴーストを細胞と融合させ、一個のゴーストと融合した一核細胞 (Fig. 8 斜線部分) だけを FACS

で集めた。ゴースト内に含まれるフラグメント A の量を変化させて、それぞれで得られた細胞の生存率を調べていったところ、次のような驚くべき結果が出た⁴²⁾。すなわち、フラグメント A は1分子で細胞を殺すらしいのである (Fig. 9)。 (Fig 9 では、ゴースト内のフラグメント A 分子数が1のとき、その生存率は約30%である。しかし、ゴースト内に取り込まれるフラグメント A の分子数はポアソン分布にしたがうと考えるとよくつじつまが合う)。

Fig. 9 細胞内に導入されたフラグメント A の分子数とその時の細胞の生存率 (Yamaizumi, *et al.*, 1979⁴²⁾より)

次にこの結果を確認するために、ジフテリア菌の変異株から得られた CRM176 というタンパクを用いて実験を行った。CRM176 はジフテリア毒素と同じ分子量をもつが、そのフラグメント A 部分に変異があるために毒性が弱い。動物に注射したときの毒性で調べると、本来の毒素の 1/100 である。この CRM176 のフラグメント A が何分子で細胞を殺すかを調べたところ、100～200分子必要であった。これは、フラグメント A が1分子で細胞を殺すという結果をよく裏付ける。またこの結果は、ゴースト法と FACS を組み合わせると、定量的に物質導入が可能であることをよりはっきりと示している。

4種類の細胞導入法について、やや詳しく解説した。実際の実験でどの方法を用いれば良いかは、かなり重要なことである。フラグメント A のように、enzymatically に働く物質では 5.1 や 5.2 の方法が利用できるが、多く

の量を入れないと有効でない物質にはゴースト法を用いるべきであろう。それぞれの方法で、どれだけの量を細胞内に導入できるかについては省略する⁵²⁾。

6. おわりに

本稿の目的は、HVJ による融合現象が細胞研究のいろいろな場面に利用できることを紹介することであった。おそらくこの目的は十分達成されていないと思う。今回の内容に関して、他者の著作、総説⁵²⁻⁵⁴⁾にも詳しく書かれているのでぜひ参照していただきたい。

文 献

- 1) Okada, Y.: *Biken's J.*, **1**, 103-110 (1958)
- 2) Shimizu, K., Shimizu, Y. K., Kohama, Y., Ishida, N.: *Virology*, **62**, 90-101 (1974)
- 3) Scheid, A., Choppin, P. W.: *Virology*, **57**, 475-490 (1974)
- 4) Tozawa, H., Watanabe, M., Ishida, N.: *Virology*, **55**, 242-253 (1973)
- 5) Portner, A., Scroggs, R. A.: *Virology*, **67**, 179 (1975)
- 6) Homma, M.: *J. Virol.*, **9**, 829-835 (1972)
- 7) Hosaka, Y., Shimizu, Y. K.: *Virology*, **49**, 627-639 (1972)
- 8) Ohuchi, M., Homma, M.: *J. Virol.*, **18**, 1147-1150 (1976)
- 9) Homma, M., Ohuchi, M.: *J. Virol.*, **12**, 1457-1465 (1973)
- 10) Hsu, M.C., Sheid, A., Choppin, P. W.: *Virology*, **95**, 476-491 (1979)
- 11) Nakanishi, M., Uchida, T., Okada, Y.: *Cell Struct. Funct.*, **4**, 382 (1979)
- 12) Ozawa, M., Asano, A.: (日本ウイルス学会予講集 1980)
- 13) Okada, Y., Murayama, F., Yamada, K.: *Virology*, **27**, 115-130 (1966)
- 14) Okada, Y., Murayama, F.: *Exp. Cell Res.*, **44**, 527-551 (1966)
- 15) Miyake, Y., Kim, J., Okada, Y.: *Exp. Cell. Res.*, **116**, 167-178 (1978)
- 16) Maeda, Y., Kim, J., Koseki, I., Mekada, E., Shio-kawa, Y., Okada, Y.: *Exp. Cell Res.*, **108**, 95-106 (1977)
- 17) Sekiguchi, K., Asano, A.: *Proc. N.A.S.*, **75**, 1740-1744 (1978)
- 18) Okada, Y.: Virus-Cell interaction during cell fusion by virus (Mechanisms of cell change, ed. by J. Ebert and T. Okada) John Wiley & Sons, Inc. (1979)
- 19) Mekada, E., Uchida, T., Okada, Y.: *Exp. Cell Res.*, **123**, 137-146 (1979)
- 20) Okada, Y., Kim, J., Maeda, Y., Koseki, I.: *Proc. N.A.S.*, **71**, 2043-2047 (1974)
- 21) Kim, J., Mitsui, H., Okada, Y.: *Cell Struct. Funct.*, **1**, 237-249 (1976)
- 22) 金在万: 未発表データ
- 23) Okada, Y., Koseki, I., Kim, J., Maeda, Y., Hashimoto, T., Kanno, Y., Matsui, Y.: *Exp. Cell Res.*, **93**, 368-378 (1975)
- 24) Tanaka, K., Sekiguchi, M., Okada, Y.: *Proc. N.A.S.*, **72**, 4071-4075 (1975)
- 25) Frye, L. D., Edidin, M.: *J. Cell Sci.*, **7**, 319 (1970)
- 26) Orly, J., Schramm, M.: *Proc. N.A.S.*, **73**, 4410-4414 (1976)
- 27) Rodbell, M.: *Nature*, **284**, 17-22 (1980)
- 28) Eimerl, S., Neufeld, G., Korner, M., Schramm, M.: *Proc. N.A.S.*, **77**, 760-764 (1980)
- 29) Vopsky, D. J., Cabantchik, Z. I., Beigl, M., Loyter, A.: *Proc. N.A.S.*, **76**, 5440-5446 (1979)
- 30) Gurdon, J. B.: The control of gene expression in animal development. Oxford Univ. Press, London, 1970
- 31) Graessmann, M., Graessmann, A.: *Proc. N.A.S.*, **73**, 366 (1976)
- 32) Yamaizumi, M., Uchida, T., Okada, Y.: *Virology*, **95**, 218-221 (1979)
- 33) 内田驍: 医学のあゆみ, **112**, 659-666 (1980)
- 34) 内田驍: 医学のあゆみ, **112**, 981-989 (1980)
- 35) Uchida, T., Miyake, Y., Yamaizumi, M., Mekada, E., Okada, Y.: *B.B.R.C.*, **87**, 371 (1979)
- 36) Uchida, T., Kim, J., Yamaizumi, M., Miyake, Y., Okada, Y.: *J. Cell Biol.*, **80**, 10 (1979)
- 37) Poste, G., Papahdjopoulos, D., Vail, W. J.: *Meth. Cell Biol.*, **14**, 33 (1976)
- 38) Pagano, R. E., Takeichi, M.: *J. Cell Biol.*, **74**, 531 (1977)
- 39) Furusawa, M., Nishimura, T., Yamaizumi, M., Okada, Y.: *Nature*, **248**, 449 (1974)
- 40) 山泉克: 生体の科学, **29**, 303-308 (1978)
- 41) Yamaizumi, M., Uchida, T., Okada, Y., Furusawa, M.: *Cell*, **13**, 227-232 (1978)
- 42) Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T., Okada, Y.: *Cell*, **15**, 245- (1978)
- 43) Mekada, E., Yamaizumi, M., Uchida, T., Okada, Y.: *J. Histochem., Cytochem.*, **26**, 1067-1073 (1978)
- 44) Capecchi, M. R., Vonder Haar R. A., Capecchi, N. E., Sveda, M. M.: *Cell*, **12**, 371 (1977)
- 45) Kaltoft, K., Zedthen, J., Engbaek, F., Piper, P. W., Celis, J. E.: *Proc. N.A.S.*, **73**, 2793 (1976)
- 46) Wasserman, M., Zakai, N., Loyter, A., Kulka, R.G.: *Cell*, **7**, 551 (1976)
- 47) Yamaizumi, M., Uchida, T., Mekada, E., Okada, Y.: *Cell*, **18**, 1009-1014 (1979)
- 48) Schlegel, R. A., Rechsteiner, M. C.: *Cell*, **5**, 371 (1975)
- 49) Yamaizumi, M., Uchida, T., Okada, Y., Furusawa, M., Mitsui, H.: *Nature*, **273**, 782 (1978)
- 50) Herzenberg, L. A., Sweet, R. G., Herzenberg, L. A.:

- Scientific American*, **234**, 108-117 (1976)
- 51) Furusawa, M., Yamaizumi, M., Nishimura, T., Uchida, T., Okada, Y.: *Meth. Cell Biol.*, **14**, 73 (1976)
- 52) Uchida, T., Yamaizumi, M., Mekada, E., Okada, Y.: Methods using HVJ (Sendai virus) for introducing substances into viable mammalian cells. (in Introduction of macromolecules into viable mammalian cells, Ed. by Baserga R., Croce, C., Rovera, G., Alan R. Liss, Inc., New York (1980)
- 53) 本間守男, 田代真人: 日本細菌学雑誌, **34**, 779-795 (1979)
- 54) 岡田善雄: 細胞融合と細胞工学, 講談社, 1976

生体膜関係の国際学会について

1980

May 9-11: Cedzina, Poland, National Membrane Symposium, Information from: Prof. S. Przystalski, Institute of Biology and Biophysics, Agricultural Academy, Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland

July 7-11: Wye, England, 16th Harden Conference on Function of Microtubules and Microfilaments, Information from: The Biochemical Society, 1 Warwick Court, London, WC1R 5DP, England

July 21-24: Debrecen, Hungary, Satellite Meeting to the International Physiological Congress on "Neural Communication and Control: Facts and Theories", Write to: Prof. G. Szekely, Institute of Anatomy, University of Medicine, 4012 Debrecen, Hungary

August 17-30: Spetsai, Greece, New Methods in Membrane Research and Biological Transduction, Information from: Dr. G. C. Papageorgiou, NCR Demokritos, Dept. of Biology, Agia Paraskevi, Athens, Greece

September 7-20: Glasgow, U. K., EMBO Course on Molecular Approaches to Cell Differentiation, Information from: Beatson Institute for Cancer Research, Garscube Estate, Bearsden, Glasgow G61 1BD, U. K.

September 7-13: Chalkidiki, Greece, 5th International Congress on Photosynthesis, Write to: Prof. G. Akoyunoglou, Greek Atomic Energy Commission, Nuclear Research Center "Demokritos", Department of Biology

Aghia Paraskevi, Attiki, Greece

September: Brighton, U. K., Satellite Symposium to the European Neuroscience Congress on "Nonlinear Analysis of Neural Sensory Systems", Write to: Dr. P. Johannesma, Lab. of Medical Physics & Biophysics, University of Nijmegen, Geert Grote Plein Noord 21, 6525 EZ Nijmegen, The Netherlands

September/October: Yugoslavia, International Meeting on "The Structure and Physical Properties of Water in Biological Systems", Write to: Dr. S. Maricic, National and University Library, Marulicev trg 21, P. O. B. 550, 41001 Zagreb, Yugoslavia

September 1-6: Carry-le-Rouet, France, 9th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Write to: Dr. J. Fournier, COMABIO 9, Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau Cedex, France

1981

May 4-13: Michalowice, Poland, International School on Biophysics of Membrane Transp., Information from: Prof. S. Przystalski, Institute of Biology and Biophysics, Agricultural Academy, 50-375 Wrocław, Poland

1981: Reinhardsbrunn Castle, GDR, 3. Symposium on the Biophysics of the Cell Surface, Information from: Prof. R. Glaser, Section Biology, Division Biophysics, Humboldt University, 104 Berlin, GDR

(Semenza, BM-Circular No. 8)