〔原 著〕

ヒト培養細胞及びマウステラトカルシノーマ
胚様体からの抗(U1)RNP抗体を用いた
U1-snRNPの精製とその蛋白質成分に関する研究*

松田基夫**・藤谷英男**

Summary

The U1-snRNP particles from the nuclear extracts of human KB cells and mouse teratocarcinoma embryoid bodies (OTT6050), purified by SLE-anti-(U1)RNP antibody affinity chromatography, were analyzed for their protein components. The purified human U1-snRNP was recovered from the column by elution with 2.5M MgCl₂ at pH7.2 after the column had been washed with Tris-buffer containing DOC, Triton X-100 and 1.0 M NaCl. The ³H amino acid-labeled protein components of human (KB) U1-snRNP resolved into three major bands with apparent molecular weights of 69,000, 58,000 and 35,000 upon SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Highly purified U1-snRNP particles containing U1a and U1b RNAs as their sole nucleic acid moieties were obtained from the mouse teratocarcinoma embryoid bodies by the same procedure as used for purification of KB cell U1-snRNP. By gel electrophoresis, five major polypeptides, with apparent molecular weights of 80,000, 76,000, 72,000, 58,000 and 39,000, were detected associated with U1-snRNP(s) of embryoid bodies.

Key words : U-small nuclear ribonucleoprotein, systemic lupus erythematosus, antibody affinity chromatography, mouse teratocarcinoma embryoid bodies.

はじめに

真核生物の細胞核内に存在するU系 small nuclear ribonucleoprotein (以下 U-snRNP) は mRNA 前駆体のスプライシング^{1,2)}やポリアデニル化³⁾への関与をはじめいくつかの興味ある生物学的機能が示唆され⁴⁾, これら U-snRNP を分離・精製しその蛋白質成分を同定する試みが抗 sm や抗 (U1) RNP 抗体をプローブとした免疫学的方法⁵⁻⁷⁾や生化学的方法^{8,9)}を用いて行わ

れてきた。しかしこれらに関する報告中にはまず U-snRNP の RNA 成分の純度に関して少なからぬ問題点が認められる。またその蛋白質成分に関してもそれぞれかなりの差異が認められそれ故 U-snRNP の蛋白質成分は未確定のままである。

著者らはすでに本誌上において、³H ウリジン標識 RNA をプローブとした単一 U1 RNA を含む U1-snRNP の分離・精製とその試験管内再構成実験の結果について報告した¹⁰⁾。その様な成果の上になって今

*Studies on highly purified U1-snRNP particles from KB cells and mouse teratocarcinoma embryoid bodies (OTT6050) that react with polyclonal anti-(U1) RNP antibodies.

**Motoo Matsuda, Hideo Fujitani, 麻布大学獣医学部分子生物学教室。
(受付1984年9月27日, 受理1984年10月23日)

回はず15種の ^3H アミノ酸混合物で標識されたヒト KB 細胞核抽出液を出発材料として、前回報告した方法に準じて U1-snRNP の分離・精製を行いその蛋白質成分の解析を試みた。次にこれら確立された精製方法を用いてマウステラトカルシノーマ胚様体より U1-snRNP を分離・精製しその RNA 成分及び蛋白質成分を解析し、KB 細胞より得られた結果と比較検討した。そして最後に今回得られた結果及び従来報告されている結果を含めて討論し考察を加えた。

実験材料及び方法

1. 細胞及びアイソトープ標識

ヒト KB 細胞 (160×10^6) を30分間、15種アミノ酸の飢餓処理をした後に、2.5mCi の15種の ^3H アミノ酸混合物を添加して30分間標識した。次に5%馬血清を含む Joklik regular medium による2度の希釈を行った後に、ひき続き16時間標識した。 ^3H ウリジンをを用いた KB 細胞の標識は報告されている方法に準じて行った¹⁰⁾。テラトカルシノーマ胚様体 (OTT6050)¹¹⁾ は129/sv 系マウス腹腔で移植継代しそこより回収したものを実験に用いた。

2. 細胞核抽出液及び低分子量画分 (約 $\leq 12\text{S}$) の調製と抗 (U1) RNP 抗体免疫アフィニティカラムの作成及びカラムクロマトグラフィ

これらについてはすでに報告されている方法に準じて行った¹⁰⁾。

3. 蛋白質成分の解析

抗 (U1) RNP 抗体免疫アフィニティカラムクロマトグラフィを行った後に直ちに、得られた溶出液をあらかじめオートクレーブ処理をした蒸留水に対して4℃で透析した。つづいて真空凍結乾燥によって濃縮し、

電気泳動試料用緩衝液に溶かした。蛋白質試料は Laemmli ゲル電気泳動¹²⁾、フルオログラフィ法^{13,14)} 及び Anderson ゲル電気泳動¹⁵⁾、クマシーブルー染色法によって解析した。

4. RNA 成分の解析

RNA はすでに報告されている方法¹⁰⁾に準じて調製し、7M 尿素-10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分画した後にフルオログラフィ^{13,14)} 及びアクリジンオレンジ染色法により解析した。

結 果

本誌上において著者らがすでに報告した U1-snRNP の分離・精製方法は1) hnRNP の調製条件下でシヨ糖密度勾配遠心法を用いてほとんどすべての U1-snRNP を低分子量画分中へ濃縮する事及び2) 免疫アフィニティカラムクロマトグラフィの塩濃度の段階的上昇を伴う溶出方法を採用し10 mM Tris-HCl, pH7.4, 1mM EDTA, 1M NaCl, 1% DOC, 1% Triton X-100 及び0.1mM PMSF (以下 DOC-Triton X-100-1 M NaCl) 緩衝液による溶出の後に2.5 M MgCl_2 , pH7.2でカラムからの全添加試料の溶出を試みる事の特徴としたものであった¹⁰⁾。この様な溶出方法によって、最終的に2.5M MgCl_2 によるカラムからの溶出によって得られる U1-snRNP パーティクルは U1 RNA 以外の他の RNA 成分が混入していたり、あるいは U1 RNA が分解したりしていない高純度の標品であった。さらに試験管内再構成実験及びパーティクルゲル電気泳動の結果よりそれらは再構成能力を有し、約9~10Sの沈降定数を有するパーティクルである事が強く示唆された¹⁰⁾。この様に高純度の U1-snRNP を分離・精製するための方法を Table 1に要

Table 1. Summary of the procedure for isolation of the U1-snRNP particle

- 1) Radiolabeling of cells with radioactive uridine and amino acids
- 2) Isolation of the nuclei and their disruption by sonication
- 3) Fractionation of the nuclear extract to obtain the low molecular weight fraction (about $\leq 12\text{S}$) by (5-20%) linear sucrose density gradient ultracentrifugation
- 4) Fractionation of the low molecular weight nuclear components by anti-(U1)-RNP antibody affinity column chromatography to obtain highly purified U1-snRNP particles that are eluted with 2.5 M MgCl_2 after stepwise elution of the column with increasing NaCl concentration

Fig.1. 7M urea-10% polyacrylamide gel analysis of RNA of U1-snRNP from human KB cells (2) and cytoplasmic ^3H -RNA of KB cells was also fractionated (1). The RNA bands were detected by fluorography.

Fig.2. SDS - polyacrylamide (Laemmli) gel analysis of 15 ^3H -amino acid mixture-labeled polypeptides from affinity chromatography using anti-(U1) RNP antibody. A low molecular weight fraction of nuclear extract from human KB cells was used as starting material for chromatography. The samples in the lanes shown are : flow through (1), 0.5M NaCl eluate (2), DOC-Triton X-100 1.0M NaCl eluate (3) and 2.5 M MgCl_2 , pH7.2 eluate (4) from the column. ^{14}C -labeled proteins were used as molecular weight standards (5). The protein bands were visualized by fluorography.

約した。又この様な方法で再現性よく得られるヒトKB細胞のU1-snRNP パーティクルのRNA成分をFig. 1, 2 に示した。

さて本研究においては、まず15種の ^3H アミノ酸混合物で標識された細胞核抽出液より調製された低分子量画分を前回の方法に準じて正常ヒトIgG及びPansorbinを用いて処理し、得られた上清を直ちに抗(U1)RNP抗体アフィニティカラムへの添加試料とした。Table 2に抗(U1)RNP抗体免疫アフィニティカラムから溶出された各溶出液中の ^3H の放射活性値を示した。表から明らかな様にカラムに添加された放射活性の約60%がカラムに吸着されずに素通りした。DOC-Triton X-100 1M NaCl 緩衝液による溶出の後に2.5 M MgCl_2 , pH7.2によって溶出される画分中の放射活性はカラム添加試料の全放射活性の約17%に相当し

た。この値は他の異なる実験においても15~23%の範囲で再現性よく認められた。なおこの溶出方法ではカラムに添加された全放射活性の95%以上が回収された。

次に、得られた各溶出液中の蛋白質成分を12.5%ボリアクリルアミドLaemmliゲル電気泳動法¹⁰⁾により解析した(Fig. 2)。Fig. 2-4は2.5 M MgCl_2 溶出液中のU1-snRNP パーティクルの蛋白質成分について得られた結果を示している。明らかに結果は2.5 M MgCl_2 で抗(U1)RNP抗体カラムより溶出されるU1

Table 2. Amounts of ^3H radioactivity in each eluate from the column

1) material loaded on the column	350,000(cpm)	100.0(%)
2) flow-through from the column and buffered 0.2 M NaCl eluate	210,000	60.0
3) buffered 0.5 M NaCl eluate	41,000	11.7
4) buffered DOC-Triton X-100-1.0 M NaCl eluate	25,000	7.1
5) 2.5 M MgCl_2 , pH 7.2 eluate	61,000	17.4

Buffered NaCl consists of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.05% NP 40, 0.1 mM PMSF and NaCl of indicated concentration. Buffered DOC-Triton X-100-1.0 M NaCl contains 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 1 % DOC, 1 % Triton X-100 and 0.1 mM PMSF.

Fig.3. 7M urea-10% polyacrylamide gel analysis of RNA of U1-snRNP from mouse embryoid bodies.

a : the RNA gel stained with acrydine orange.

b : the RNA bands were scanned at 550 nm.

-snRNP の蛋白質成分は分子量が約69,000, 58,000及び35,000のポリペプチドからなる事を示唆している (Fig. 2-4). なお KB 細胞を用いて得られた U1-snRNP の蛋白質成分に関するこの結果は, 本論文の著者の一人松田が共著者の一人となって最近報告された結果¹⁶⁾ (同様な抗 (U1)RNP 抗体カラムからの溶出方法であるが2.5M MgCl_2 の代りに2M 塩化リチウム・4M 尿素を含む40mM トリス pH7.4緩衝液を U1-snRNP の溶出のために用いた) と一致し, それを支持するものである. なおこれら69,000, 58,000及び

35,000のポリペプチドは2.5M MgCl_2 以前の溶出段階, すなわち0.5M NaCl を含む緩衝液や DOC-Triton x-100-1.0 M NaCl 緩衝液による溶出では検出されなかった (Fig. 2-2-3).

以上の様に我々が確立した ^3H ウリジン及び15種の ^3H アミノ酸混合物で放射性標識された細胞核抽出液を出発材料とした U1-snRNP の分離・精製方法はその標品の純度, 再現性, 収量等を指標とした場合にきわめて有効ですぐれた方法である事が明らかとなった. そこでつぎにマウスの未分化胚性腫瘍細胞 (embryonal carcinoma stem cell) の U1-snRNP を解析しこれらを比較検討する事を目的としてまずその胚様体の U1-snRNP の分離・精製のためにこれら方法を適用する事を試みた. Fig. 3 a にヒト KB 細胞の U1-snRNP を分離・精製するために用いられたものと同じの抗体カラムを用いてマウス胚性腫瘍胚様体より分離・精製された U1-snRNP の RNA 成分を 7M 尿素-10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分画した結果を示した. これより明らかな様に段階的塩濃度の上昇を伴う溶出方法で2.5M MgCl_2 でカラムより溶出される溶出液中の RNA 成分は U1a 及び U1b RNA である. またこれら RNA 成分のスクランニングを試みたところその量比は U1a : U1b = 約 5 : 1 である事を示唆する結果が得られた (Fig. 3 b). つぎに同様の方法で分離・精製された胚様体の U1-snRNP パーティクルの蛋白質成分を SDS ゲル電気泳動法によって解析しその結果を Fig. 4 a-4 に示した. 得られたゲルパターンは明らかに胚様体の U1-snRNP の蛋白質成分は分子量が約80,000, 76,000, 72,000, 58,000及び39,000に相当する5つのポリペプチドより成る事を示唆している. さらに U1-snRNP

Fig.4. SDS-polyacrylamide (Anderson) gel analysis of polypeptides of U1-snRNP (s) from embryoid bodies. a, 1: bovine serum albumin, 2: carbonic anhydrase, 3: lysozyme, were used as molecular weight standards. 4: polypeptides of U1-snRNP (s) from embryoid bodies. (b) polypeptides of U1-snRNP (s) eluted from the column constructed with sera of another SLE patient. Protein bands were visualized by Coomassie brilliant blue staining.

に高い抗体価を示す他の SLE 患者の血清を用いて調製された抗 (U1) RNP 抗体カラムを用いて同様の方法で 2.5 M $MgCl_2$, pH 7.2 で溶出された胚様体の U1-snRNP の蛋白質成分もまた Fig. 4 a-4 と同じ電気泳動パターンを示した (Fig. 4 b).

考 察

本研究において、まず 15 種の 3H アミノ酸混合物で標識されたヒト KB 細胞核抽出液を出発材料として、著者らがすでに報告した U1-snRNP パーティクルを得るための精製方法を用いて分離・精製された U1-snRNP の蛋白質成分は分子量が約 69,000, 58,000 及び 35,000 の 3 つのポリペプチドより成る事が示唆され

た。このポリペプチドのパターンは他の異なる実験及び他の SLE 患者の血清より調製した抗 (U1) RNP 抗体を用いた実験でも再現性よく認められた。

Lerner らはマウスエールリッヒ細胞より免疫沈降法を用いて分離した U1-snRNP の蛋白質成分に関して、分子量が 12,000-35,000 の間に 7 個 (A-G) の異なるポリペプチドが存在すると報告している⁵⁾。又 Gibbons らは免疫化学的方法を用いたウサギ胸腺のアセトン粉末を出発材料とした実験で、分子量が 10,000-15,000 の間に 5 個の U1-snRNP ポリペプチドを検出し報告している⁷⁾。これらの報告においてはいずれも今回著者らが報告した KB 細胞の約 69,000 に相当するポリペプチドは認められていない。Takano らは子牛胸腺を用いて、分子量 65,000 のものが 1 個、30,000 のものが 2 個及び 12,000-13,000 の間に 5 個より成る合計 8 個の U1-snRNP 蛋白質成分を報告している⁶⁾。この分子量 65,000 と 30,000 の蛋白質は著者が今回報告した 69,000 と 35,000 蛋白質に相当するのかもしれない。

一方 Steitz のグループ¹⁷⁾や Berget のグループ¹⁸⁾は生化学的方法を用いて最近 U1-snRNP の分離・精製を試みた結果、その蛋白質成分は分子量 68,000-11,000 の間に少なくとも 9 個存在すると報告した。しかしその詳細についてはお互いの間にかなりの差異が認められる。

今回の我々の報告で明らかな様に、我々の分離・精製方法で精製された U1-snRNP パーティクルでヒト KB 細胞においてもマウス胚様体においても分子量が 11,000-30,000 の間の領域に相当するポリペプチド成分は検出されなかった。我々の U1-snRNP 標品中でこれら低分子量領域の蛋白質が検出出来ない理由は現在のところ不明であるが、カラムからの回収率及び標品の調製過程を通しての回収率などからこれら蛋白質が分離・精製の過程で分解したり消失したりしたとは考えにくい。又電気泳動の際にこれら低分子量蛋白質が集合して見かけ上高分子量蛋白質が生じる可能性は完全には否定は出来ないが、我々の場合は泳動直前に試料を SDS 及びメルカプトエタノールの存在下で煮沸-急冷処理を行い、直ちに泳動を開始しているので、この可能性はないように思われる。これらの差異の原因についてはすべて今後の研究の発展によって究明されなければならないが、White らの native な抗原性を有する U1-snRNP パーティクルの構成高分子量 70K

蛋白質は限定的加水分解を受け易いという見解¹⁹⁾を含めて詳細な検討が必要となっているものと思われる。

ヒト KB 細胞及びマウス胚様体の両方で一致して今回見出された 58,000 のポリペプチドはオートラジオグラフィ法及び染色法のどちらを用いた場合も U1-snRNP の構成蛋白質としてはこれまで報告されていないのはじめてのものである。本ポリペプチドの諸性状の解明については今後の研究にまたねばならない。従来 snRNP の蛋白質成分の検出方法として、放射性アイソトープによる細胞標識-オートラジオグラフィ法を用いる場合主に ³⁵S-メチオニンなどの 1 個の放射性アミノ酸を用いた方法が採用されて来た^{5,17,18)}。今回は 15 種の ³H-アミノ酸混合物を用いて、より proportional な細胞の放射性標識方法を採用した事がこの様な 58,000 蛋白質の検出を可能にしたのかもしれない。

これまでマウステラトカルシノーマの snRNP に関する報告はまだない。マウステラトカルシノーマ胚様体は未分化の胚性がん細胞を一層の内胚葉性の細胞層が包んでいるものであり、これは腹水腫瘍でかつマウスの 3~5 日胚に対してきわめて高い類似性を有するという特性を示すものである^{20,21)}。それ故この様な未分化胚性腫瘍細胞系は真核生物の分化とがん化に関わる遺伝子発現の調節の分子機構を解析する上できわめてすぐれた実験系であるとされている²²⁾。

報告した胚様体 U1-snRNP の RNA 成分は他のいくつかの報告にみられる様な高分子量 RNA の混入が認められず、U1a と U1b RNA から成っており、それ故得られた U1-snRNP はきわめて純度の高いものである事が示唆される。胚様体の U1-snRNP を構成している U1a RNA と U1b RNA 成分の量比はアクリジンオレンジによる染色後のスキャンニングの結果 (Fig. 3b) より約 5 : 1 である事が示唆された。これは、従来の報告中で、マウスエールリッヒ細胞より分離された U1-snRNP⁹⁾ の場合やフレンド白血病細胞¹⁷⁾ の様なマウス細胞を材料とした場合でほぼ 1 : 1 と観察される事から、胚様体あるいはテラトカルシノーマ細胞独特のものである可能性があり大変興味深い。

さて報告した胚様体の U1-snRNP の蛋白質成分は、ゲル電気泳動による結果より、80,000, 76,000, 72,000, 58,000 及び 39,000 の 5 個のポリペプチドより成っている事が示唆された。これは従来報告されている U1-snRNP とくらべて比較的高分子量のポリペプチドを 3 個 (80,000, 76,000, 72,000) 含んでおり、

又今回報告したヒト KB 細胞の結果とはこの部分に大きな差異が存在する。これら胚様体 U1-snRNP の蛋白質成分の分子量の総計は約 325,000 となり、これは KB 細胞の場合の 172,000 の約 2 倍に相当する。又この様な胚様体 U1-snRNP の蛋白質成分に関する値は、ほぼ推定され得る、RNA 成分を含めた snRNP の分子量値約 200,000 前後の範囲内には留まらない。これら胚様体 U1-snRNP の蛋白質成分がすべて単一のパーティクルの構成成分である可能性は勿論否定出来ないが、胚様体は異なる分化能を有し、異なる分化レベルにある細胞集合体である事や、U1a RNA と U1b RNA がそれぞれ蛋白質成分と結合して U1-snRNP を構築している事などから、これら胚様体の U1 snRNP に多様性が存在する可能性があるのではないかと我々は考えている。そこで我々は蛋白質成分の集合形態の可能性として 1) 80,000, 58,000, 39,000, 2) 76,000, 58,000, 39,000, 3) 72,000, 58,000, 39,000 の 3 種類を想定し、あるいは 80,000 と 76,000 が 72,000 の何らかの修飾型である可能性もあり得ると考えている。そこで我々は現在この様ないくつかの可能性を仮説的に想定しつつ、胚様体 OTT 6050 inner core の株化細胞である F9 や PCC4 などのクローン細胞の U1-snRNP を解析する事によってこれらを解明しようと研究を継続中である。

結 論

全身性エリテマトーデスの自己抗 (U1) RNP 抗体を用いて、ヒト KB 細胞及びマウステラトカルシノーマ胚様体より U1-snRNP パーティクルの分離・精製を行いその蛋白質成分を解析した。

15 種の ³H アミノ酸混合物であらかじめ標識されたヒト KB 細胞及び 129 系マウスの腹腔より回収したテラトカルシノーマ胚様体よりそれぞれ調製された細胞核抽出液を実験の出発材料として用いた。

抗体アフィニティカラムの段階的塩濃度の上昇を伴う溶出方法で DOC-Triton X-100-1.0 M NaCl 緩衝液の後に 2.5M MgCl₂, pH7.2 で溶出される高純度 U1-snRNP パーティクルの蛋白質成分は KB 細胞では分子量約 69,000, 58,000 及び 35,000 の 3 つのポリペプチドより成る事が示唆された。

同様なカラムの溶出方法を用いてテラトカルシノーマ胚様体より RNA 成分として U1a と U1b RNA を含む高純度の U1-snRNP を分離・精製する事が出来た。

得られた胚様体 U1-snRNP の蛋白質成分について解析を行ったところ, 80,000, 76,000, 72,000, 58,000 及び 35,000 の 5 種のポリペプチド成分を認めた。これら胚様体 U1-snRNP の蛋白質成分を KB 細胞の結果及び従来の報告と比較検討し, 胚様体の可能ないくつかの U1-snRNP の存在形態について考察した。

謝 辞

稿を終るに臨み本研究遂行のため御援助及び御討論をいただいた金沢大学がん研究所分子生物部亀山忠典教授, 飯田克平助教授そして野村孝弘先生に感謝します。また心からの御援助をいただいた東京薬科大学臨床生化学教室須賀哲也教授, 松本善雄先生に感謝します。

文 献

- 1) Murray, v. and Holliday, R. : FEBS Lett., **106** : 5, 1979.
- 2) Lerner, M.R. et al. : Nature, **283** : 220, 1980.
- 3) Berget, S.M. : Nature, **309** : 179, 1984.
- 4) Busch, H. et al. : Ann. Rev. Biochem., **51** : 617, 1982.
- 5) Lerner, M.R. and Steitz, J.A. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **76** : 5495, 1979.
- 6) Takano, M. et al. : Biochemistry, **20** : 5929, 1981.
- 7) Gibbons, Jr. J.J. et al. : Mol. Immun., **19** : 765, 1982.
- 8) Raj, N. et al. : Biochemistry, **14** : 80, 1975.
- 9) Sri-Widada, J. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **104** : 457, 1982.
- 10) 松田基夫 : 生物物理化学, **27** : 337, 1983.
- 11) Stevens, L.c. : Dev. Biol., **21** : 364, 1970.
- 12) Laemmli, U.K. : Nature, **227** : 680, 1970.
- 13) Bonner, W.M. and Laskey, R.A., : Eur. J. Biochem., **46** : 83, 1974.
- 14) Laskey, R.A. and Mills, A.D. : Eur.J. Biochem., **56** : 335, 1975.
- 15) Anderson, B.L. et al. : Anal. Biochem., **132** : 365, 1983.
- 16) Marti, A. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun. **123** : 345, 1984.
- 17) Hinterberger, M. et al. : J. Biol. Chem., **258** : 2604, 1983.
- 18) Kinlaw, C.S. et al. : J. Biol. Chem., **258** : 7181, 1983.
- 19) White, P.J. et al. : J. Immun., **128** : 2751, 1982.
- 20) Månsson, P-E. and Harris, S.E. : Biochemistry, **18** : 2703, 1979.
- 21) 広田幸敬, 高垣洋太郎 : 自然, **31** : 40, 1976.
- 22) Martin, G.R. : Science, **209** : 768, 1980.