薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
115 (5) 390—393 (1995)

組換え型ヒトインターフェロン IFN- α 2 と IFN- ω 1 の抗ウイルス活性

杉山憲司,^a Tilman VOSS,^b Horst AHORN,^b Ingrid MAURER-FOGY,^b
Edward L. BARSOUMIAN*,^a

日本ベーリンガーインゲルハイム（株）川西医薬研究所 分子生物学研究部,^a
ベーリンガーインゲルハイム ベンダー社 蛋白工学研究部^b

Relation between Structure and Anti-viral Activity in Interferon System

Kenji SUGIYAMA,^a Tilman VOSS,^b Horst AHORN,^b
Ingrid MAURER-FOGY,^b and Edward L. BARSOUMIAN*,^a

*Nippon Boehringer Ingelheim Co. Ltd., Kawanishi Pharma Research Institute
Molecular and Cellular Biology Department,^a 3-10-1, Yato,
Kawanishi 666-01 Japan and Ernst-Boehringer Institute
für Arzneimittelforschung, Department of Protein
Chemistry, Bender & Co. Dr. Boehringer-Gasse,^b
5-11 A-1121, Vienna Austria*

(Received October 24, 1994)

The interferons (IFN) were discovered in 1957 as biological agents interfering with viral replication. IFNs were initially classified according to their sources as leukocyte, fibroblast and immune IFNs. Both leukocyte and fibroblast IFNs are designated as Type I IFNs and immune IFN as a Type II IFN. There are almost twenty related IFNs which belong to the group of Type I IFN. IFN- α 2 and IFN- ω 1 are described as members of the large group of Type I IFN. Both natural IFN- α 2 and IFN- ω 1 are isolated from human leukocytes. IFN- α 2 carries an O-linked carbohydrate moiety, whereas IFN- ω 1 has an N-linked complex oligosaccharide.

Recombinant IFN- α 2 expressed in *E. coli* and Sf-9 cells have been characterized. Moreover, recombinant IFN- ω 1 expressed in CHO cells and Sf-9 cells have also been characterized. In the present study, the recombinant human IFN- α 2 and IFN- ω 1 were analyzed for their anti-viral activity compared with native products.

Key words——IFN- α 2; IFN- ω 1; glycosylation; anti-viral activity

インターフェロンは1957年に最初に抗ウイルス作用を持つ物質として発見され、現在ではいくつかの異なった種類のタンパク質に分類されている。すなわち大きく分類して、白血球型インターフェロン (IFN- α 及び IFN- ω) と線維芽細胞インターフェロン (IFN- β) をI型インターフェロンとして、また免疫インターフェロン (IFN- γ) をII型として2つのタイプが存在している。そのうちでも、ヒトのリンパ球よりI型インターフェロンに属するIFN- α 2¹⁾ 及びIFN- ω 1²⁾ の遺伝子はすでにクローニングされており、それぞれの糖鎖の修飾部位すなわち、

IFN- $\alpha 2$ は O-グリコシレーション一方, IFN- $\omega 1$ は N-グリコシレーションされていること及びその構造は明らかにされている.

今回我々は, 大腸菌, CHO 細胞及び昆虫細胞^{3,4)}を用いて作製した IFN- $\alpha 2$ 及び IFN- $\omega 1$ の抗ウイルス活性について解析を行った.

実 験 の 部

リコンビナント IFN- $\alpha 2$ の作成 大腸菌, CHO (Chinese hamster ovary) 細胞及び粟夜盗蛾由来 Sf-9 細胞 (*Spodoptera frugiperda*) に IFN- $\alpha 2$ 遺伝子を導入することにより,³⁾ リコンビナント IFN- $\alpha 2$ (rIFN- $\alpha 2$) を多く含んだ細胞上清を得た. rIFN- $\alpha 2$ は抗 IFN- $\alpha 2$ モノクローナル抗体 (EBI-1) を用いたイミノアフィニティーカラムに吸着した後, リン酸緩衝液にて洗浄後 0.1 M クエン酸 25% エチレングリコール/pH 2.5 にて溶出しリン酸緩衝液に対して透析した.

さらに得られた精製物を逆相高速液体クロマトグラフィー (Bakerbond RP C₁₈ column, 5 μ m, 30 nm pore size, Baker) にて精製した.

リコンビナント IFN- $\omega 1$ の作成 大腸菌, CHO (Chinese hamster ovary) 細胞及び粟夜盗蛾由来 Sf-9 細胞 (*Spodoptera frugiperda*) に IFN- $\omega 1$ 遺伝子を導入することにより,⁴⁾ リコンビナント IFN- $\omega 1$ (rIFN- $\omega 1$) を多く含んだ細胞上清を得た. rIFN- $\omega 1$ は抗 IFN- $\omega 1$ モノクローナル抗体 (OMG4) を用いたイミノアフィニティーカラムに吸着した後, リン酸緩衝液にて洗浄後 0.1 M クエン酸 25% エチレングリコール/pH 2.5 にて溶出しリン酸緩衝液に対して透析した.

さらに得られた精製物を逆相高速液体クロマトグラフィー (Bakerbond RP C₁₈ column, 5 μ m, 30 nm pore size, Baker) にて精製した.

抗ウイルス活性の測定 ヒト肺カルシノーマ細胞由来 A549 細胞をマイクロタイタープレートを用いて 37°C にて培養し, マウス由来 encephalomyocarditis ウイルスの影響の阻害を WHO-スタンダード Gxa01-901-535 を指標にして測定し, 抗ウイルス活性のユニット値の計算を行った.²⁾

結 果 及 び 考 察

I. IFN- $\alpha 2$ の構造とその抗ウイルス活性

我々は既に大腸菌⁵⁾ 及び昆虫細胞 (Sf-9 cell)³⁾ を用いてヒト型 IFN- $\alpha 2$ を作製しその構造を明らかにしている. 近年, 昆虫細胞系を用いたタンパク質の大量発現法⁶⁾ が広く用いられており, その特徴として 3 次構造及び糖鎖の修飾が天然のものに近い形で得られるという点があげられる. 大腸菌由来 IFN- $\alpha 2$ は当然側鎖に糖鎖の修飾を受けないが, 昆虫細胞由来 IFN- $\alpha 2$ では天然型同様 106 番目のスレオニンが糖鎖の修飾を受けていることが明らかとなっている.¹⁾ 天然型 IFN- $\alpha 2$ では末端にシアル酸が存在するなど比較的複雑な構造を有しているのに対して昆虫由来 IFN- $\alpha 2$ ではシアル酸が存在せず天然型よりも単純な構造を有している (Table 1). この大腸菌及び昆虫細胞由来 IFN- $\alpha 2$ の抗ウイルス活性を測定したところ, Table 2 に示すように天然型 IFN- $\alpha 2$ との大きな差は認められなかった. 以上のことから, IFN- $\alpha 2$ の抗ウイルス活性については, 糖鎖の構造は重要でないことが示唆される.

これまでに IFN- $\beta 1$ では, 大腸菌を用いて作製しても天然型同様に抗ウイルス活性を有していることが報告されており,⁷⁾ 我々の結果とよく一致している. IFN のレセプターが糖鎖の修飾を受けているにもかかわらず, 糖鎖を持たない IFN が同様にレセプターと結合することも報告されており,⁸⁾ この点からも大腸菌由来 IFN- $\alpha 2$ が天然型と同様の抗ウイルス活性を有し

Table 1. Thr-106 of Human IFN- α 2 is O-Glycosylated

Native ¹⁾	Sf-9 cell ³⁾
Gal-GalNAc-	Gal-GalNAc-
Gal-GlcNAc	GalNAc-
NeuAc-Gal-GalNAc-	
Gal-GalNAc-	

Gal, Galactose; GalNAc, *N*-Acetylgalactosamine; NeuAc, *N*-Acetylneuraminic acid; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine.

Table 2. Anti-viral Activity of IFN- α 2

Product	IU/mg
Sf-9 cell ^{a)}	2.4×10^8
<i>E. coli</i> ^{a)}	2.3×10^8
Native	2.8×10^8

a) Recombinant IFN- α 2 derived from anti-viral activity was calculated with Gxa01-901-535 (WHO standard).²⁾

ていることも理解できる。

II. IFN- ω 1 の構造とその抗ウイルス活性

I 型インターフェロンに属する IFN- α 2 及び IFN- β 1 の抗ウイルス活性が共に糖鎖の構造に影響されないことから、同じ I 型インターフェロンに属する IFN- ω 1 も同様の挙動を示すことが予想される。我々はすでに CHO 細胞²⁾ 及び昆虫細胞⁴⁾ を用いてヒト型 IFN- ω 1 を作製しその構造を明らかにしている。共に、78 番目のアスパラギンが糖鎖の修飾を受けているが、SDS ポリアクリルアミド電気泳動による解析から分子量の違いが認められる⁴⁾ ことから糖鎖の構造が異なっていることが示唆される。この 2 種類のリコンビナント分子を用いて IFN- α 2 の場合と同様に抗ウイルス活性を測定したところ、Table 3 に示すように、昆虫細胞由来 IFN- ω 1 では CHO 細胞由来 IFN- ω 1 と比較して、1/3 の値しか得られなかった。CHO 細胞由来 IFN- ω 1 の値は天然型 IFN- ω 1 の値と等しいことが報告されていることから、糖鎖の構造の変化による 3 次元構造の変化が考えられる。Table 4 に昆虫細胞由来 IFN- ω 1 の糖鎖の構造を示すが、CHO 細胞由来 IFN- ω 1 は分子量が大いことが知られており、より複雑な糖鎖の構造を有していることが示唆されている。²⁾ しかしながら、CD スペクトルを用いて解析しても大きな差異は認められなかったことから 3 次元構造には大きな差はないと考えられる。⁴⁾

そこで我々はこの差異が宿主細胞由来であるか否かを検討することを目的として、C-末端の 9 個のアミノ酸を欠如した IFN- ω 1 を CHO 細胞を用いて作製し、抗 IFN- ω 1 抗体を用いて同様の方法で精製し、その抗ウイルス活性を測定したところ、抗ウイルス活性は 1/2 にまで減少した。以上のことから IFN- ω 1 の抗ウイルス活性は糖鎖の構造の変化及び C-末端のアミノ酸の欠如によって大きく減少することが示唆される。

Table 3. Anti-viral Activity of IFN- ω 1

Product	IU/mg
Sf-9 cell ^{a)}	0.9×10^8
CHO ^{a)}	2.7×10^8
Native	2.7×10^8

a) Recombinant IFN- ω 1 derived from anti-viral activity was calculated with Gxa01-901-535 (WHO standard).²⁾

Table 4. Carbohydrate Structure of Baculoviral IFN- ω 1

(Man) ₃ (GlcNAc) ₂ [Fuc]
(Man) ₂ (GlcNAc) ₂ [Fuc]

Man, mannose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; Fuc, fucose.

Natural IFN- ω 1 was shown to have *N*-acetylglucosamine, galactose and neuraminic acid moiety.⁴⁾ The structure of native IFN- ω 1 is unclear because of its complexity compared to recombinant baculoviral product.

これまでに、IFN の系で糖鎖の構造の変化によって抗ウイルス活性が大きく影響を受ける例は報告されていない。しかしながら、IFN の生体内での安定性についてはこれまでに *in vitro* の系では IFN- β と IFN- γ が 56°C での安定性が糖鎖を除くと落ちてしまうことが報告されている。⁸⁾ さらに、*in vivo* の系では、ウサギを用いた実験で、糖鎖のシアル酸を除くと天然型 IFN よりも生体内で早く消失してしまうことが報告されており、⁹⁾ 天然型の構造が生体内での安定性に深く寄与していると考えられる。他方、抗体で精製した IFN- $\alpha 2$ 及び IFN- $\omega 1$ をさらに逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて精製すると IFN- $\alpha 2$ の場合は抗ウイルス活性は全く影響されないが IFN- $\omega 1$ の場合はさらに 1/2 に抗ウイルス活性が減少してしまうことから、天然型そのものの構造が抗ウイルス活性に重要であると考えられる。

結 語

我々は大腸菌、CHO 細胞、昆虫細胞を用いてヒト型リコンビナント IFN- $\alpha 2$ 及び IFN- $\omega 1$ を作製しその抗ウイルス活性を測定したところ、IFN- $\alpha 2$ では種々の方法間の違いは見られなかったが IFN- $\omega 1$ では違いが見られた。

これまでに、IFN- $\beta 1$ については糖鎖の修飾は抗ウイルス活性には寄与しないことが報告されているが、⁸⁾ 昆虫細胞を用いて作製した IFN- $\alpha 2$ でも同様の結果が得られた。IFN- $\omega 1$ における抗ウイルス活性の違いは 3 次元構造による影響が考えられるが、CD-スペクトルの測定からは糖鎖の修飾による大きな 3 次元構造の変化は見られなかった。⁴⁾ C-末端の 9 アミノ酸を除いただけでも抗ウイルス活性が減少することから、IFN- $\omega 1$ の場合は天然の構造そのものが生物学的活性に重要であることが示唆される。

引 用 文 献

- 1) Adolf G. R., Kalsner I., Ahorn H., Maurer-Fogy I., Cantell K., *Biochem. J.*, **276**, 511 (1991).
- 2) Adolf G. R., Maurer-Fogy I., Kalsner I., Cantell K., *J. Biol. Chem.*, **265**, 9290 (1990).
- 3) Sugiyama K., Ahorn H., Maurer-Fogy I., Voss T., *Eur. J. Biochem.*, **217**, 921 (1993).
- 4) Voss T., Ergülen E., Ahorn H., Kubelka V., Sugiyama K., Maurer-Fogy I., Glössl J., *Eur. J. Biochem.*, **217**, 913 (1993).
- 5) Bodo G., Maurer-Fogy I., *The interferon system*, **24**, 23 (1986).
- 6) Summers M. D., Smith G. E., "Manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures," Texas A&M University Press, College Station TX, 1987.
- 7) Derynck R., Content J., DeClercq E., Volckaert G., Tavernier J., Devos R., Fiers W., *Nature* (London), **285**, 547 (1980).
- 8) Joshi A. R., Sarkar F. H., Gupta S. L., *J. Biol. Chem.*, **257**, 13884 (1982).
- 9) Bocci V., Di Francesco P., Pacini A., Pessina G. P., Rossi G. B., Sorrentino V., *Antiviral Res.*, **3**, 53 (1983).