

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580392

研究課題名（和文） 難治性病態における急性期蛋白糖鎖応答のダイナミズムと糖鎖機能改変モデルの構築

研究課題名（英文） DYNAMISM OF GLYCAN CHAIN RESPONSE IN ACUTE PHASE PROTEINS ON SEVERE DISEASE CONDITIONS AND MODIFICATION OF GLYCAN CHAIN FUNCTION

研究代表者

岩田 祐之 (IWATA HIROYUKI)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：40193750

研究成果の概要（和文）：難治性病態における急性期蛋白糖鎖応答のダイナミズムと糖鎖機能改変モデルの構築を目的に、炎症に伴って上昇する血中糖蛋白（ $\alpha 1$ 酸性糖蛋白）を、ウシ血清およびネコ腹水から精製分離し、またウシ、ネコ、マウスにおいて組換え蛋白発現・精製を行い、糖鎖解析のためのモノクローナル抗体作製を試み、各動物に対して異なるエピトープを認識する抗体を得た。さらに、ウシ白血病やネココロナウイルス感染症（伝染性腹膜炎）での血中上昇・糖鎖変調等がみられること、本蛋白遺伝子の mRNA 検出が可能となったことから、基礎研究への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：For the purpose of analyses on dynamism of glycan chain response in acute phase proteins under severe disease conditions, alpha-1 acid glycoprotein (AGP) in bovine, and feline were purified from sera and ascites, respectively, and recombinant AGP were also purified. These proteins were used for the preparation of monoclonal antibodies (Mabs) for the analyses of AGPs. In results, several Mabs for each animal were obtained and analysed for the epitopes of each AGP, which were useful for quantification of AGPs and analyses of glycan chain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：急性期蛋白， $\alpha 1$ 酸性糖蛋白，糖鎖修飾，腫瘍，ウイルス

1. 研究開始当初の背景

糖鎖生物学は多様な修飾や機能や学際領域のため、近年多数の研究者がその解明に携わるようになったが、医学的応用に関しては

研究の緒にあり、その展開が期待されている。我々は既に牛白血病において AGP の ConA 低親和性糖鎖修飾を発見し、これはリンパ球抑制作用が強い。また、脱シアル化は血小板の

凝集を抑制し、炎症時のフコシル化糖鎖は Sialyl Lewis X 抗原(以下 SleX)を付加し、これは血管上皮細胞の E-selectin や P-selectin に結合し、白血球の炎症部位への浸潤を抑制するなど免疫病態および防御機構に重要であり、炎症の抑制などに関与する。さらに、インフルエンザウイルスの赤血球凝集抑制作用を有する。近年 BSE や SARS コロナウイルス感染症などの新興感染症には難治性のものが多く、大きな社会的な問題となっている。多くの難治性ウイルス感染症はウイルス抗原あるいは抗体の検出による診断がなされるが、必ずしも免疫病態を表すわけではなく、診断・予後の判定・病態解明に十分ではない。中でも、AGP は難治性ウイルス疾患、白血病や肝癌などの特異マーカーとなりうることで報告されており、動物疾患あるいはヒト疾患モデルにおける利用は極めて有用と考えられている。国内外の獣医学領域における急性期糖蛋白質学は主として炎症性疾患における定量によるものであるが、糖鎖の質的変動および細胞内糖鎖修飾に着目し、多種の動物で比較医学的に追求することで急性期糖蛋白質に対する新たな概念・モデルを提供することが期待される。

2. 研究の目的

蛋白質の糖鎖修飾は特異的な立体構造を決定し、外環境に対して安定化するだけでなく、細胞間接着、ウイルス中和能、免疫防御あるいは抑制など多くの機能発現に密接に関連し、これらの機能解明による次世代型材料・医薬品開発への展開が期待されている。また、各種病態での糖鎖修飾変動は機能発現・変調を招来することから、その病態生理学的背景を理解する上で重要な情報を提供する。中でも、急性期糖蛋白質とくに α_1 酸性糖蛋白質(以下 AGP)は正常では肝細胞、肺および腸管などの上皮細胞に発現し、生体の恒常性維持に重要な役割を担うが、急性および慢性炎症、ならびにリンパ腫などの腫瘍性疾患で増加するとともに、糖鎖構造が変化し、新規機能を発現する。本研究では基礎から応用・臨床までを有機的に統合するいわゆるトランスレーショナルリサーチを目指し、ウイルス感染症や腫瘍などの難治性疾患における糖鎖構造変化を解明し、することで、病態解明、診断や予後の判定に寄与するだけでなく、創薬開発の基礎を築くことを目的としており、比較医学・獣医臨床学に大きく貢献するものと予想される。

3. 研究の方法

難治性ウイルス感染症ならびに腫瘍における急性期糖蛋白質変動解明と新規機能発見を目的に α_1 酸性糖蛋白質(AGP)の基礎研究および臨床動態について以下の研究

を実施した。

(1) 体液からの AGP の精製

ウシ血清について硫酸アンモニウム沈殿、等電点沈殿を行い、その可溶性画分について2種のイオン交換カラムクロマトグラフィーによりウシ AGP を精製した。次にネコ腹水(心疾患罹患ネコ)について同様に硫酸アンモニウム沈殿、等電点沈殿を行い、可溶性画分をイオン交換カラムクロマトグラフィー、次いでゲル濾過法によりネコ AGP を精製した。

(2) 組換え AGP 蛋白発現

ウシ、ネコ、マウス肝臓から mRNA を抽出し、既知の塩基配列 data を基に RT-PCR 法により、AGP 遺伝子の遺伝子検出を行った。既に得られている cDNA から pET ベクターを用いてチオレドキシンの組換え融合蛋白を作製し、AGP を精製した。

(3) モノクローナル抗体の作製

糖鎖構造、エピトープ解析および定量系開発を目的に AGP に対するモノクローナル抗体を作製した。抗原には血清または腹水から精製した AGP ならびに大腸菌発現系で精製した AGP を用いた。免疫動物にはマウスおよび/またはラットを用い、アジュバントには Immunogold®を用い、2週間隔で1~2回免疫した。モノクローナル抗体作製は免疫動物の脾細胞または膝窩リンパ節細胞とミエローマ細胞を融合させた後、ELISA スクリーニングおよびクローニングにより、モノクローナル抗体を選別した。

(4) モノクローナル抗体の認識するエピトープ

各モノクローナル抗体の認識するエピトープに違いがみられるかどうかについて、競合 ELISA 法、各種抗原に対する Western blott 法と ELISA 法により検討した。

(5) 定量法

ウシ血清 AGP 濃度の定量については単純放射状免疫拡散法による定量を実施し、ネコ AGP については direct ELISA 法により定量を行った。すなわち、被検血清を direct に ELISA プレートに吸着させた後、一次抗体としてウサギ抗血清を、二次抗体として HRP 標識ウサギ IgG 抗体を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 動物 AGP の性状

ウシの血清 AGP は SDS-PAGE により分子量 31~40 kDa の淡い蛋白バンドとして観察され、等電点 3.5~4.0 を示し、糖組成

およびアミノ酸組成から、AGP であることが確認されている。また、ネコの腹水由来 AGP は SDS-PAGE では分子量 40~50kDa に淡い染色性を示す broad な蛋白バンドを示し、硫酸・酸に対して高い可溶性を持ち、等電点 3.7 以下であることから、AGP であることが確認された。尚、通常のアミノ酸配列解析ができなかったことから、糖鎖等による N 末端修飾が推測された。

(2) AGP cDNA クローニング

①ウシ（黒毛和種）の肝細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により遺伝子増幅を行い、ウシ AGP 遺伝子の cDNA を得た。ウシ AGP 遺伝子は、翻訳領域は 609 塩基からなり、一部に品種の違いと考えられる変異が認められたが、既知のデータとほぼ一致しており、5 つの N-glycosylation site を有していた。

②ネコ（雑種）では肝細胞からは目的の増幅産物は得られなかった。そこで、ネコゲノム遺伝子配列データベースを基に、cDNA を作製した。予想された全翻訳領域は 603 塩基でウシ同様 5 つの N-glycosylation site を有していた。

③マウス（ICR 系）に LPS 50 μ g を腹腔内投与した後、肝細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法により遺伝子増幅を行い、マウス AGP 遺伝子の cDNA を得た。マウス AGP 遺伝子の全翻訳領域は 621 塩基であり、部分的に系統差と考えられる変異がみられたが、Balb/c とほぼ一致していた。また、5 つの N-glycosylation site を有していた。

(3) AGP の in vitro 発現

①マウス AGPcDNA について大腸菌での蛋白発現を試みた。その結果、可溶性画分に約 37kDa の蛋白が観察され、目的のチオレドキシンの融合蛋白であると推定された。これらの蛋白を精製し、Enterokinase による切断と tag 蛋白の除去を行ってさらに精製したところ、マウス AGP と考えられる約 22kDa の蛋白バンドが得られた。

②ウシ AGP cDNA を大腸菌発現系にて蛋白発現を試みたところ、約 40kDa の融合蛋白として発現し、タグ蛋白除去後は約 24kDa の蛋白が見られた。血清から精製した AGP は約 40 kDa であり、約 40% の糖鎖を有していることが明らかとなった。得られた蛋白は抗体作製及び定量系での標準蛋白として利用可能であることが示された。

③ネコ AGPcDNA を用いて大腸菌発現系にて蛋白発現を試みたところ、約 40kDa の融合蛋白が得られた。タグ蛋白除去後は約 24 kDa の蛋白であり、約 40% の糖鎖を有していることが示された。

(4) モノクローナル抗体の作製とエピトープ

性状解析

①精製されたマウス AGP を用いて常法によりラットモノクローナル抗体の作製を試みた。その結果、5 クローンのマウス AGP 抗体陽性ハイブリドーマが得られた。MAb の免疫グロブリンのクラスは IgG 2a が 2 クローン、IgG2b が 1 クローン、2 クローンが IgA であり、L 鎖のタイプはいずれも κ 鎖であった。次に得られたモノクローナル抗体を用いて immunoblot 解析を行なったところ、5 クローンのうち 3 クローンが、大腸菌で発現させたマウス AGP を特異的に認識することが明らかとなった。このことから、今回得られた 3 クローンのモノクローナル抗体はマウス AGP の一次構造を認識するが、残り 2 クローンはその立体構造を認識する可能性が考えられた。さらに、異なるエピトープを認識するかどうかを Additive - ELISA を用いて解析した。その結果、2 クローンが異なるエピトープを認識する可能性が示唆された。

②大腸菌で発現・精製したウシ AGP を用いて常法によりモノクローナル抗体の作製を試みた。免疫にはラットを用い、フットパッドに注射し、膝下リンパ節を回収して細胞融合を行った。また血清対して 4 種（マウス 2 種から精製したウシ AGP も抗原として用いた。その結果、8 種のモノクローナル抗体が得られ、血清 AGP に：IgM, κ , ラット 2 種：IgG2b, κ), 大腸菌発現 AGP に対して 4 種（ラット：2 種の IgG2a, 2 種の IgG2b, κ) が得られ、異なるエピトープを認識する可能性が示唆された。

③ネコでは 8 クローンが得られ、そのアイソタイプは (L 鎖) は IgG1 (λ 鎖), IgG2b (λ 鎖), IgA (κ 鎖) であった。Western blot 解析では、いずれの MAb も還元状態では AGP を認識せず、非還元状態の AGP を認識することから、これらは AGP の立体構造を認識することが示唆された。また、競合 ELISA 法によるエピトープ解析の結果から、今回得られた MAb は同一あるいはオーバーラップするエピトープを認識する可能性が示された。

(5) 糖鎖解析

ウシでは ConA 親和性の高い画分と低い画分が存在し、Mannose 結合性の異なる分子が存在した。ネコでは ConA, DSA, SAA, UEA-1 と結合したことから、Man, GlcNAc, Sia α 2-6Gal/GalNAc, Fuc α 1-2Gal β -1-4GlcNAc の糖鎖構造を有することが確認された。また、混合型 2 分岐グリカンあるいは 3 分岐以上のグリカンの糖鎖を有することが判明した。

(6) AGP 定量法

①ネコ AGP に対するウサギ抗血清を作製し、そこで血清 AGP 濃度を測定するために SRID と direct binding ELISA を行った。

SRID では精製蛋白に対して沈降輪を形成したが、ネコ血清での沈降輪は不明瞭であった。Direct ELISA では、AGP 濃度 0.02-0.25 µg/ml の範囲で測定可能であり、ネコ血清中 AGP レベルは 1.37 ± 1.147 (平均値 ± 標準偏差) mg/ml であった。特に、猫伝染性腹膜炎(コロナウイルス感染症)において高値を示した。以上のことから、この定量系は将来 FIP の診断あるいは急性期反応の指標として有用であると考えられた。

②ウシ AGP に対するウサギ抗血清を用いて血中濃度を単純放射状免疫拡散法にて測定可能であり、正常血清濃度は約 0.01~1.0 mg/ml の範囲で測定可能である。

その他、難治性疾患(リーシュマニア症・日本脳炎・レプトスピラ症など)における疫学・病態に関する基礎的知見も得た。詳細は発表論文を参照されたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Fujita M, Kato H, Cáceres AG, Gomez EA, Velez L, Mimori T, Zhang F, Iwata H, Korenaga M, Sakurai T, Katakura K, Hashiguchi Y, Genotyping of sand fly species in Peruvian Andes where leishmaniasis is endemic, *Acta Tropica*, 121, 93-98, 2012, 査読有.
- ② Umeki S, Suzuki R, Shimojima M, Ema Y, Yanase T, Iwata H, Okuda M, Mizuno T, Characterization of monoclonal antibodies against canine P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 142, 119-125, 2011, 査読有.
- ③ Kato H, Gomez EA, Cáceres AG, Vargas F, Mimori T, Yamamoto K, Iwata H, Korenaga M, Velez L, Hashiguchi Y, Natural infections of man-biting sand flies by *Leishmania* and *Trypanosoma* species in the northern Peruvian Andes. *Vector Borne Zoonotic Disease*, 11, 515-521, 2011, 査読有.
- ④ Kato H, Cáceres AG, Mimori T, Ishimaru Y, Sayed AS, Fujita M, Iwata H, Uezato H, Velez LN, Gomez EA, Hashiguchi Y, Use of FTA cards for direct sampling of patients' lesions in the ecological study of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 3661-3665, 2010, 査読有.
- ⑤ Shimoda H, Ohno Y, Mochizuki M, Iwata H, Okuda M, Maeda K, Dogs as sentinels for human infection with Japanese encephalitis virus, *Emerging Infectious Disease*, 16, 1137-1139, 2010, 査読有.
- ⑥ Kato H, Uezato H, Sato H, Bhutto AM, Soomro FR, Baloch JH, Iwata H, Hashiguchi Y, Natural infection of the sand fly *Phlebotomus kazeruni* by *Trypanosoma* species in Pakistan. *Parasite Vectors*, 3:10, 2010, 査読有.
- ⑦ Kato H, Jochim RC, Sakoda R, Iwata H, Gomez EA, Valenzuela JG, Hashiguchi Y, A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the blood-sucking bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease, *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 184-191, 2010, 査読有.
- ⑧ Kuwahara K, Kato H, Gomez EA, Uezato H, Mimori T, Yamamoto Y, Calvopiña M, Cáceres AG, Iwata H, Hashiguchi Y, Genetic diversity of ribosomal RNA internal transcribed spacer sequences in *Lutzomyia* species from areas endemic for New World cutaneous leishmaniasis, *Acta Tropica*, 112, 131-136, 2009, 査読有.
- ⑨ Dong JB, Saito A, Mine Y, Sakuraba Y, Nibe K, Goto Y, Komase K, Nakayama T, Miyata H, Iwata H, Haga T, Adaptation of wild-type measles virus to cotton rat lung cells: E89K mutation in matrix protein contributes to its fitness, *Virus Genes*, 39, 330-334, 2009, 査読有.
- ⑩ Iwamoto E, Wada Y, Fujisaki Y, Umeki S, Jones MY, Mizuno T, Itamoto K, Maeda K, Iwata H, Okuda M. Nationwide survey of leptospira antibodies in dogs in Japan: results from microscopic agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay, *Journal of Veterinary Medical Science*, 71, 1191-1199, 2009, 査読有.
- ⑪ Hamasaki R, Kato H, Terayama Y, Iwata H, Valenzuela JG, Functional characterization of a salivary apyrase from the sand fly, *Phlebotomus duboscqi*, a vector of *Leishmania major*, *Journal of Insect Physiology*, 55, 1044-1049, 2009, 査読有.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 加藤大智, 濱崎亮一, 寺山好美, 岩田祐之, Jesus Valenzuela, リーシュマニア原虫媒介サシチョウバエ *Phlebotomus duboscqi* の唾液アピラーゼの機能解析, 第 149 回日本獣医学会学術集会, 2010 年 3 月 28 日, 日本獣医生命科学大学, 東京.
- ② 藤田恵, 加藤大智, Abraham Caceres, 岩田祐之, Eduardo Gomez, 橋口義久, ペルーにおけるサシチョウバエの遺伝子タイピング法の確立, 第 149 回日本獣医学会学術集会, 2010 年 3 月 28 日, 日本獣医生命科学大学, 東京.
- ③ 石丸由佳, 加藤大智, 藤田恵, 岩田祐之, Eduardo Gomez, 橋口義久, シャーガス病媒介サシガメ *Triatoma dimidiata* 唾液中にみとめられた triabin 様タンパクの機能解析, 2010 年 3 月 28 日, 日本獣医生命科学大学, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 祐之 (IWATA HIROYUKI)
山口大学・農学部・教授
研究者番号 : 40193750

(2) 研究分担者

前田 健 (MAEDA KEN)
山口大学・農学部・教授
研究者番号 : 90284273

加藤 大智 (KATO HIROTOMO)
山口大学・農学部・准教授
研究者番号 : 00346579
(H21-22)