

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580461

研究課題名(和文) 難治性病態における急性期蛋白糖鎖修飾モデルのトランスレーショナル研究の新展開

研究課題名(英文) Translational research on modified glycosylation model for acute phase protein in severe disease conditions

研究代表者

岩田 祐之 (Iwata, Hiroyuki)

山口大学・獣医学部・教授

研究者番号：40193750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

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修飾モデルを検出・構築し、実験動物から臨床対象への新たな診断・治療の開発を目的として、動物の α -1酸性糖蛋白(AGP)を分離精製し、また組換え蛋白発現・精製を行い、これらを抗原としてモノクローナル抗体を作製した。各動物に対して異なるエピトープを認識する抗体が得られ、マウスについては酵素抗体法による定量系を開発し、炎症モデルにおける血中上昇およびlectin ELISAによる糖鎖変調等が観察された。また、糖鎖付加改変AGPの哺乳動物細胞発現では種々の分泌パターンを示し、糖鎖改変モデルの有用なツールとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of translational research on modified glycosylation model for acute phase protein in severe disease conditions, native α -1 acid glycoproteins (AGPs) in animals were purified and recombinant AGPs were also expressed in bacteria and purified. These proteins were used for the preparation of monoclonal antibodies (Mabs) and several Mabs for each animal were recognized with different epitopes for each AGP. In murine, enzyme linked immunoassay system for AGP was developed and its serum levels were increased and its glycan chains were modified on lectin affinity analysis. Furthermore, different excretion patterns of recombinant AGPs which have altered glycan chains were observed on expression in mammalian cells, suggesting that this expression models might be a useful tool for the analyses of glycan chain modification.

研究分野：農学

キーワード：急性期蛋白 α -1酸性糖蛋白 糖鎖修飾 モノクローナル抗体 炎症モデル 組換え蛋白

1. 研究開始当初の背景

糖鎖生物学は多様な修飾や機能, 学際領域を含む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. 重要な血清急性期糖蛋白である AGP の測定は医学領域ではルーチン検査の一つとして利用され, 獣医学領域でも応用され始めている. その診断的意義については不明の点も多いが, 有用な情報の提供も多い. 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. 脱シアル化は血小板の凝集を抑制し, また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. 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, 糖尿病などの糖代謝異常ではフコシル化の亢進がみられ, その阻害剤は血糖値を低下させる. 一方, 新興感染症である BSE や SARS コロナウイルスなどの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. AGP は難治性ウイルス疾患, 白血病や肝癌・大腸癌などの特異マーカーとなりうる事が報告されており, 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る. 国内外の獣医学領域における急性期糖蛋白学は主として炎症性疾患における定量であるが, 個体毎の糖鎖解析法の開発, 機能性リガンドの探索と機能解明により急性期糖蛋白に対する新たな概念が提供できる.

2. 研究の目的

「糖鎖科学の新展開」は新規機能の解明・次世代型材料・医薬品開発をもたらす, 急性期蛋白の糖鎖研究にも新たな展開が予想される. 糖鎖はリガンドとの相互作用により, 細胞間接着, ウイルス中和, 免疫防御など多くの機能に密接に関連する. 本研究では基礎から応用・臨床までを有機的に統合するトランスレーショナル研究を目指し, 難治性病態における急性期糖蛋白の糖鎖構造の解析手法の開発を中心として, 生体あるいは病原体蛋白の機能性リガンドの探索

およびその機能解明へと展開させ, その糖鎖ダイナミズムを究明するとともに, 疾患モデルおよび臨床例における糖鎖変調を解明することを目的とし, 創薬開発の基礎を築く. 具体的には, 難治性病態での変動が予想されている動物 1 酸性糖蛋白 (AGP) について定量系および糖鎖修飾解析系を確立するため, 抗原精製と組換え蛋白発現, モノクローナル抗体作製, 酵素抗体法 (ELISA 法) の開発, lectin ELISA による糖鎖解析法の開発, 糖鎖改変モデルの開発, 疾患モデルへの応用を目的とする.

3. 研究の方法

難治性病態における急性期糖蛋白変動解明と新規機能の発見を目的に 1 酸性糖蛋白 (AGP) の基礎研究および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, マウス肝臓から mRNA を抽出し, 既知の塩基配列を基に RT-PCR 法により, AGP cDNA を増幅した. また, ネコでは既知の配列から成熟蛋白をコードする cDNA を PCR 法により得た. これらをそれぞれ pET ベクターを用いてチオレドキシンの組換え融合蛋白として発現・精製し, 組換え AGP を得た.

(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は，競合 ELISA 法，ならびに分割して発現させた組換え AGP を抗原とした Western blott 法により検討した．

(5) ELISA 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 法により定量を既に確立している．マウスについてはサンドイッチ ELISA 法を試みた．すなわち，認識するエピトープの異なる 2 種類のモノクローナル抗体の一方を capture 抗体として 96 穴プレートに固層化した後，抗原を加えて反応させ，Biotin 化抗体をさらに反応させる．さらに，Avidin-HRP および基質を反応させて発色させた．

(6) 糖鎖改変 AGP の哺乳動物細胞発現

AGP には 5 つの N 結合型糖鎖付加部位があるが，これを欠損した AGP を発現させるため，それぞれの糖鎖結合部位のアスパラギン (N) をグルタミン (Q) に置き換えた mutant を KOD-plus-Mutagenesis Kit を用いて pCA7/AGP mutant を作製した．得られた mutant プラスミドは Polyethylenimine max を用いて 293T 細胞に transfection し，AGP 発現を Western blott 法および免疫沈降法により検出，半定量を行った．

4．研究成果

(1) 動物 AGP の分離精製

ウシ AGP (血清) および ネコ AGP (腹水) についてはイオン交換クロマトグラフィーを主に利用して精製している．ウシおよびマウスについてはシグナル配列を除いた cDNA をクローニングし，大腸菌による組換え蛋白を発現した．また，マウス AGP については哺乳動物細胞による組換え蛋白発現を行った．

(2) 動物 AGP に対するモノクローナル抗体の作製

常法によりモノクローナル抗体の作製を試みた．ウシについては 8 種のモノクローナル抗体が得られており，血清 AGP に対して 4 種 (マウス抗体 2 種，ラット抗体 2 種)，大腸菌発現 AGP に対して 4 種 (ラット抗体) が得られている．ネコについては腹水より精製した AGP に対して 6 種のマウスモノクローナル抗体が得られており，マウスについては 4 種のモノクローナル抗体 (ラット) が得られた．

(3) 動物 AGP に対するモノクローナル抗体のエピトープ解析

マウス AGP に対して得られた 4 種のモノクローナル抗体は全て大腸菌組換え蛋白を認識したが，哺乳動物細胞組換え蛋白に対しては 3 クローンが認識し，2 種類以上のエピトープを認識する可能性が示唆された．また，ウシおよびネコでも異なるエピトープを認識する可能性が additive ELISA によって示唆されている．

一方，N 末端から種々の長さの組換え蛋白を作製し，そのエピトープ解析を行ったところ，マウス AGP では native な AGP を認識する抗体は #2H14 および #30 の 2 種であり，アミノ酸配列 150 番目以降を認識し，近接するが，異なるエピトープを認識することが示されている．ウシでは 4 種 (#EC2, #3C5, #2B5, #2G3) は 169-202 aa に存在するエピトープを認識し，1 種 (#FD4) は 65-120 aa を認識する可能性が示された．特に 169 aa 以降には糖鎖付加部位が無く，糖鎖付加に関わらず，ウシ AGP を定量できる ELISA 系の確立に有用と考えられた

(4) ELISA による AGP 定量系の確立

ELISA 定量系を確立するため，マウス AGP モノクローナル抗体のエピトープ解析を行ったところ，native な AGP を認識する抗体は #2H4 および #30 であり，アミノ酸配列 150 番目以降を認識し，近接するが，異なるエピトープを認識する可能性が示された．そこで，sandwich ELISA 法によるマウス血清 AGP 濃度を測定したところ，1.0-2.0 μ g/ml となり，既報値と比べて低い値となり，native な AGP と組換え AGP の抗体への affinity の違いによるものと考えられた．また，SPR 法による測定 (Biacore) を試みたところ，特異結合は確認されたものの，affinity が低く，定量にはさらなる検討が必要と思われた．

(5) 疾患モデル動物における AGP 変動

急性炎症モデルとして、ICR マウス雄 8 週齢に LPS 20 μ g/mouse で投与し、24 時間後の血中 AGP 濃度を sandwich ELISA 法で測定したところ、無処置群が 0.49 μ g/ml であったのに対し処置群は 1.02 μ g/ml と有為に増加し、48 時間後では無処置群および PBS 投与群はそれぞれ 0.27 μ g/ml および 0.31 μ g/ml であったのに対し、0.39 μ g/ml と有為に増加していた。AGP の糖鎖末端のシアル酸付加量を推定するため、SSA(レクチン)-ELISA 法を行ったところ、無処置群および PBS 群のシアル酸比(それぞれ 4.69 および 3.31)に差はなかったのに対し、LPS 群では 0.71 と有為に減少し、急性炎症では AGP へのシアル酸付加量の減少が観察された。また、Lectin pull-down による AGP 変動に関しては、LPS 投与群で SSA だけでなく、ConA、DSA に対する affinity が強く、また分子量の大きい分画が存在した。以上のことは、疾患に応じて糖鎖付加が変動する可能性を示唆する。

(6) 糖鎖付加の AGP 分泌パターンへの影響

マウス AGP は 5 箇所(N25, N34, N76, N94, N104)の N 型糖鎖付加部位を持ち、糖鎖付加がマウス AGP の細胞外分泌に関与していることが示唆されており、マウス AGP の糖鎖付加パターンとその細胞外分泌との関連を明らかにすることを目的として、各種糖鎖付加部位を欠失させて mutant を作製し、組換え蛋白発現を試みたところ、その細胞内産生量および細胞外分泌量に差がある可能性が示唆された。

これらのうち、N25, N34 もしくは N76 を有するものはバンドがブロードになることから、この部位に複合糖鎖が付加している可能性が、一方、N94, N104 は単純糖鎖が付加している可能性が示された。また、細胞外分泌されたマウス AGP は EndoH 耐性であることから細胞外分泌には複合型糖鎖の付加が必要であることが示唆された。また、AGP の細胞外分泌には endosome を介した分泌機構に加えて、これを介さない unconventional な分泌機構も働く可能性も示されている。

その他、難治性疾患(リーシュマニア症・イバラキウイルス感染、ネコ伝染性腹膜炎など)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 8 件)

Urata M, Watanabe R, Iwata H. The host specific NS3 glycosylation pattern reflects the virulence of Ibaraki virus in different hosts. *Virus Res*, 査読有, 181, 6-10, 2014, doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.027.

Kameyama M, Chuma T, Yabata J, Tominaga K, Iwata H, Okamoto K. Prevalence and epidemiological relationship of CMY-2 AmpC β -lactamase and CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from broiler farms in Japan. *J Vet Med Sci*, 査読有, 75, 1009-1015, 2013.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/75/8/75_12-0453/_article.

Yamamoto K, Cáceres AG, Gomez EA, Mimori T, Iwata H, Korenaga M, Sakurai T, Katakura K, Hashiguchi Y, Kato H. Genetic diversity of the mitochondrial cytochrome b gene in *Lutzomyia* spp., with special reference to *Lutzomyia peruensis*, a main vector of *Leishmania (Viannia) peruviana* in the Peruvian Andes. *Acta Trop*, 査読有, 126, 156-163, 2013. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.02.007.

Ishimaru Y, Gomez EA, Zhang F, Martini-Robles L, Iwata H, Sakurai T, Katakura K, Hashiguchi Y, Kato H. Dimiconin, a novel coagulation inhibitor from the kissing bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. *J Exp Biol*, 査読有, 15;215(Pt 20), 3597-3602, 2012. <http://jeb.biologists.org/content/215/20/3597.long>.

Terada Y, Shiozaki Y, Shimoda H, Mahmoud HY, Noguchi K, Nagao Y, Shimojima M, Iwata H, Mizuno T, Okuda M, Morimoto M, Hayashi T, Tanaka Y, Mochizuki M, Maeda K. Feline infectious peritonitis virus with a large deletion in the 5'-terminal region of the spike gene retains its virulence for cats. *J Gen Virol*, 査読有, 93(Pt 9), 1930-1934, 2012. doi: 10.1099/vir.0.043992-0.

Kameyama M, Chuma T, Yokoi T, Yabata J, Tominaga K, Miyasako D, Iwata H, Okamoto K. Emergence of Salmonella enterica serovar infantis harboring Inc11 plasmid with bla(CTX-M-14) in a broiler farm in Japan. *J Vet Med Sci*, 査読有, 74, 1213-1216, 2012.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/74/9/74_11-0488/_article.

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 Trop*, 査読有, 121, 93-98, 2012.

doi: 10.1016/j.actatropica.2011.10.004.

Kameyama M, Chuma T, Nishimoto T, Oniki H, Yanagitani Y, Kanetou R, Gotou K, Shahada F, Iwata H, Okamoto K. Effect of cooled and chlorinated chiller water on Campylobacter and coliform counts on broiler carcasses during chilling at a middle-size poultry processing plant. *J Vet Med Sci*, 査読有, 74, 129-133, 2012.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/74/1/74_11-0167/_article.

[学会発表](計 5 件)

加藤大智, Gomez Eduardo, 藤田恵, 石丸由佳, 岩田祐之, 三森龍之, 上里博, 橋口義久, サシチョウバエ *Luzomya ayacuchensis* 唾液腺 RGD ペプチド Ayaduarin は2つの作用機序で止血機構を阻害する, 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014 年 9 月 9 日-11 日, 北海道大学, 北海道札幌市.

浦田真帆, 渡邊理恵, 岩田祐之, 糖鎖付加型イバラキウイルス NS3 による宿主細胞傷害性に関する研究, 第 29 回中四国ウイルス研究会 2014 年 6 月 28 日-29 日, 山口大学, 山口県山口市.

足立萌美, 渡邊理恵, 岩田祐之, 組換えイバラキウイルス VP6 を用いた抗 VP6 血清の作製と感染細胞内 VP6 の検出, 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 9 月 20 日-22 日, 岐阜大学, 岐阜県岐阜市.

浦田真帆, 渡邊理恵, 岩田祐之, イバラキウイルス感染細胞における糖鎖付加型 NS3 の発現パターンの検討, 第 155 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 3 月

28 日-30 日, 東京大学, 東京都目黒区. 亀山光博, 中馬武久, 矢端順子, 富永潔岩田祐之, 岡本嘉六, プロイラー農場における ESBL ,AmpC 型 -ラクタマーゼ産生大腸菌の分布, 第 155 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 3 月 28 日-30 日, 東京大学, 東京都目黒区.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 祐之 (IWATA HIROYUKI)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号: 40193750

(2) 研究分担者

前田 健 (MAEDA KEN)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号: 90284273

渡邊 理恵 (WATANABE RIE)
山口大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号: 50435715
(H24 - H26.10)