

平成21年6月2日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19580370  
 研究課題名（和文） 急性期蛋白の糖鎖修飾改変モデルのトランスレーショナルリサーチ  
 研究課題名（英文） TRANSLATIONAL RESEARCH ON A MODEL OF GLYCAN CHAIN MODIFICATION OF ACUTE PHASE PROTEIN  
 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：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変動解明と新規機能発見を目的に、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、各種疾患における変動、糖鎖を解析し、特にウシ白血病での血中上昇と糖鎖変動、ネココロナウイルス感染症（伝染性腹膜炎）での血中上昇がみられた。また、実験動物の肝臓から本蛋白遺伝子の mRNA 検出が可能となり、基礎研究への応用が期待される。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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。ところで、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、糖鎖の質的変動に着目しているのは本グループのみであり、また細胞内糖鎖修飾に関して高い知識を有しており、さらなる動物で追求することで急性期糖蛋白に対する新たな概念・モデルを提供する。

## 2. 研究の目的

蛋白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、急性期糖蛋白とくに $\alpha 1$ 酸性糖蛋白(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、そのメカニズムを追及するとともに機能発現について検討することで、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変動解明と新規機能発見を目的に $\alpha 1$ 酸性糖蛋白(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) AGPの精製と抗体の作製

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。これらを抗原としてウサギおよびマウスに免疫して抗血清を作製し、マウスからはモノクローナル抗体を

作製した。

### (2) 定量法の確立

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。

### (3) AGP遺伝子検出

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。

### (4) 発現細胞の検索

既に作製したウシおよびネコAGPに対するモノクローナル抗体を用いて、既存の細胞系列についてAGP発現について蛍光抗体法により検討した。また、既知の遺伝子配列に基づいてRT-PCR法による検出を併せて実施する。

### (5) AGPの糖鎖構造の解析

AGPの糖鎖構造の解析はlectin affinityを用いて実施した。すなわち、糖鎖構造に特異的なBiotin化lectin(ConA, DBA, LCA, PHA-E4, PNA, RCA120, UEA-I, WGAなど)を用いて健常あるいは疾患ネコおよびウシから分離したAGPについてWestern blot法によりそのaffinityについて比較検討する。また、ConA親和免疫電気泳動法により糖鎖修飾を検索した。

## 4. 研究成果

(1) 動物AGPの分離精製:ウシでは血清を材料として、硫酸沈殿、酸沈殿、イオン交換カラム法を組み合わせるAGPを分離精製した。精製蛋白は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、ネコの腹水を材料として、硫酸沈殿、酸沈殿、イオン交換カラム法、ゲルろ過法を組み合わせるAGPを分離精製した。精製蛋白は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、アミノ酸配列解析では定法により解析不能であったことから、糖鎖等によるN末端修飾があることが、推測された。

## (2) モノクローナル抗体の作製

精製AGPをBalb/cマウスに免疫し、常法に従ってモノクローナル抗体を作成した。その結果、ウシでは3クローンが得られ、そのアイソタイプは何れもIgM( $\lambda$ 鎖)であった。これらのモノクローナル抗体はWestern blot解析ではAGPを認識するが、糖鎖除去後では認識せず、糖鎖に関連した抗原を認識するものと推察されている。また、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IgG<sub>1</sub>( $\lambda$ 鎖)、IgG<sub>2b</sub>( $\lambda$ 鎖)、IgA( $\kappa$ 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。

## (3) 糖鎖解析

Lectin affinity により糖鎖解析を行ったところ、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  $\alpha$  2-6Gal/GalNAc, Fuc  $\alpha$  1-2Gal  $\beta$  -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。

## (4) ネコ AGP 抗血清の作製と血清濃度の測定

ネコ精製 AGP を (0.5 mg/head/回, 2-3 回, 2 週間隔) をウサギに免疫して抗血清を作製した。Ouchterlony 法においてポリクローナル抗体は AGP、ネコ血清に対して連続した沈降線を形成し、ネコ血清中の AGP を認識することが判明した。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  $\mu$ g/ml の範囲で測定可能であり、ネコ血清中 AGP レベルは  $1.37 \pm 1.147$  (平均値  $\pm$  標準偏差) mg/ml であったが、明瞭な 2 峰性を示し、正常と異常範囲を把握する data となり、正常範囲について再検討を必要とするものと考えられる。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。

## (5) ウシ血清 AGP 濃度と糖鎖変動

ウシ精製 AGP を (0.5 mg/head/回, 2-3 回, 2 週間隔) をウサギに免疫して抗血清を作製した。Ouchterlony 法においてポリクローナル抗体は AGP、ウシ血清に対して連続した沈降線を形成し、ウシ血清中の AGP を認識することが判明した。ウシの血中濃度を単純放射状免疫拡散法にて測定したところ、正常血清濃度は約 0.03 mg/ml であり、肺炎、ウシ白血病 (リンパ腫) などの疾患牛で上昇し、胎仔、アミロイドーシスなどで低値を示した。特にウシ白血病罹患牛では ConA 親和性の多形がみられている。

## (6) AGP 遺伝子検出

AGP 遺伝子検出: マウス肝臓から RNA を抽出し、AGP の遺伝子検出を試みた結果、無刺激では検出されなかったのに対し、LPS 刺激を行ったところ、検出可能であった。これから、全翻訳領域をクローニングし、大腸菌発現ベクターに組み込み、蛋白発現を試みたところ、低レベルであり、ベクターの選別、哺乳動物細胞での発現を考慮する必要があると考えられた。

その他、難治性疾患の基礎研究として FIP の病態解析、レクチンの免疫機能に及ぼす研究などを実施しており、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)

- ① Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Takeda N, Oka T, Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks, Japanese Journal of Infectious Disease, 62, 63-66, 2009, 査読有。
- ② Tarama R, Kato H, Ishikawa Y, Miyaura H, Takeyoshi M, Iwata H, Gene expression changes induced by type IV allergy-inducible chemicals in dendritic cells, Journal of Veterinary Medical Science, 70, 673-680, 2008, 査読有。
- ③ Kato H, Gomez EA, Yamamoto Y, Calvopiña M, Guevara AG, Marco JD, Barroso PA, Iwata H, Hashiguchi Y, Natural infection of Lutzomyia tortura with Leishmania (Viannia) naiffi in an Amazonian area of Ecuador, American Journal of Tropical

Medical Hygiene, 79, 438-440, 2008, 査読有.

- ④ Terayama Y, Kato H, Gomez EA, Uezato H, Calvopiña M, Iwata H, Hashiguchi Y, olecular typing of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from areas endemic for Leishmaniasis in Ecuador by PCR-RFLP of 18S ribosomal RNA gene, Journal of Veterinary Medical Science, 70, 907-913, 2008, 査読有.
- ⑤ Kato H, Cáceres AG, Gomez EA, Mimori T, Uezato H, Marco JD, Barroso PA, Iwata H, Hashiguchi Y, Molecular mass screening to incriminate sand fly vectors of Andean-type cutaneous leishmaniasis in Ecuador and Peru, American Journal of Tropical Medical Hygiene, 79, 719-721, 2008, 査読有.
- ⑥ Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H, Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan, Microbiology and Immunology 51, 177-184, 2007, 査読有.
- ⑦ Shiba N, Maeda K, Kato H, Mochizuki M, Iwata H, Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test, Veterinary Microbiology, 61, 348~352, 2007, 査読有.
- ⑧ Kato H, Uezato H, Gomez EA, Terayama Y, Calvopiña M, Iwata H, Hashiguchi Y, Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for Leishmania infection by molecular biological methods, American Journal of Tropical Medical Hygiene, 77, 324 - 329, 2007, 査読有.

[学会発表] (計4件)

- ① 寺田 豊, 芝 希望, 前田 健, 水野拓也, 甲斐一成, 望月雅美, 加藤大智, 岩田祐之, FIP 発症ネコ血清にのみ存在する感染増強機構, 第146回日本獣医学会学術集会, 2008年9月25日, 宮崎市.
- ② 黄 莉, 足立 匠, 清水佑也, 後藤義孝, 外山 潤, 田中秀典, 明石 良, 岩田祐之, 芳賀 猛, Lectin isolated from *Momordica charantia* seed is a B cell Activator, 第146回日本獣医学会学術集会, 2008年9月25日, 宮崎市.
- ③ 多良間理絵, 加藤大智, 石川陽一, 武吉正博, 岩田祐之, IV型アレルギー誘発性化学物質によって樹状細胞に誘導される遺伝子変動の解析, 第143回日本獣医学会学術集会, 2007年4月4日, つくば市.
- ④ 芝 希望, 前田 健, 加藤大智, 望月雅美,

岩田祐之, ウイルス中和試験を用いたネココロナウイルス感染の血清疫学的解析, 第143回日本獣医学会学術集会, 2007年4月3日, つくば市.

## 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・准教授  
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

### (3) 連携研究者

なし