

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07745

研究課題名(和文) 難治性病態における急性期蛋白変動の疾患特性と糖鎖ダイナミズム

研究課題名(英文) Disease specific modification and glycosylation dynamism of acute phase protein in severe disease conditions

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：1酸性糖蛋白(AGP)及びプロカルシトニン(PCT)についてモノクローナル抗体(MAb)を作製した。ウシAGPに対するMAbはC末端領域のエピトープもしくは立体構造を認識する2種類のモノクローナル抗体が得られた。マウスAGPではC末端領域の異なるエピトープを認識するMAbが得られ、サンドイッチELISAによる定量が可能となった。炎症モデルマウスでは血中AGPの増加がみられ、糖鎖修飾の増加を示す高分子量のAGPが観察された。ウシプロカルシトニンでは、N及びC末端領域のエピトープを認識するMAbが得られ、サンドイッチELISA法を確立した。また、肺炎様症状を示すウシ症例で高値を示した。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of changes of acute phase proteins and glycosylation modification in severe disease conditions, monoclonal antibodies (MAb) against bovine and murine alpha-1 acid glycoproteins (AGs) and bovine pro calcitonin (PCT) were prepared. MAbs against bovine AGP might recognize the epitope in C terminal region and the conformational epitope, but quantification ELISA was not established. In murine, MAbs against different epitopes in C terminal region of AGP were obtained and ELISA was established. In murine model with inflammation, serum AGP levels were increased in contrast with control and glycosylation modification of AGP with higher molecular weight. MAbs against bovine PCT recognized epitopes in N and C terminal regions, and quantification ELISA was established. Serum PCT levels were detected in cases with bovine respiratory disease, but not in healthy group, and higher PCT levels were quantified in continuous febrile group than in defervescent group.

研究分野：応用獣医学

キーワード：急性期蛋白 ウシ 1酸性糖蛋白 プロカルシトニン モノクローナル抗体 肺炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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 1 酸性糖蛋白 (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。人医領域では AGP は多くの疾患で様々な糖鎖修飾を受けることが知られており，その機能も変調する。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，糖鎖の質的変動に焦点を当てたものはない。一方，細菌性感染症や敗血症の疾患特性を示す急性期蛋白としてプロカルシトニン (PCT) が有用であるが，獣医学領域やマウス疾患モデルでの研究は進んでいない。本研究では，各種疾患における AGP の量的変動と糖蛋白糖鎖変調および PCT の定量を同時に解析することで，その疾患特性を見出し，急性期蛋白に対する新たな概念を提供する。

### 2. 研究の目的

本研究では難治性疾患における急性期蛋白変動を量的変動及び糖蛋白の糖鎖変調の解析により，急性期蛋白の疾患特性を明らかにすることを目的として，動物の急性期蛋白として AGP 及び PCT について native の AGP 及び組換え蛋白の AGP ならびに PCT を用いてモノクローナル抗体 (Mab) を作製し，その認識エピトープを解析するとともに，ELISA 法による定量法を確立する。次いで，AGP の糖鎖修飾に着目し，lectin 親和性による解析法を開発する。これらを基礎データとして糖鎖変動のメカニズムを LPS などの炎症性刺激に対する糖鎖付加応答の点から解析し，実験動物疾患モデルおよび臨床検体における定量的・質的変動の解析に応用する。以上を総括して，急性期糖蛋白の難治性ウイルス感染症および腫瘍性疾患，慢性疾患での変動意義を獣医臨床学あ

るいは比較動物医学モデルの分野への応用について考按したい。

### 3. 研究の方法

難治性病態における急性期蛋白変動の疾患特性の解析を目的に AGP 及び PCT 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) 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。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。ウシ PCT については遺伝子合成により cDNA を作出した。この cDNA を pET32 ベクターに挿入し，大腸菌組換え蛋白をチオレドキシ融合蛋白として作製し，精製した。

#### (2) MAb 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 MAb を作製した。抗原には血清から精製した AGP ならびに大腸菌発現系で精製した組換え AGP を用いた。免疫動物にはマウスを用い，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，クローン (MAb) を選別した。

#### (3) MAb の認識するエピトープ

各 MAb の認識するエピトープの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 Immunoblot 法及び ELISA 法により検討した。

#### (4) ELISA 法

ウシ血清 AGP 濃度の定量については直接 ELISA 法を実施し，マウス AGP 及びウシ PCT 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 種類のものクロナル抗体の一方を capture (捕捉)抗体として 96 穴プレートに固着化した後、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、ついで基質を反応させて発色させた。

#### (5) 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) ウシ AGP に対する MAb) のエピトープ解析と ELISA 法の確立

ウシ血清から精製した AGP 及び組換え蛋白を抗原として作製した 6 種の MAb は ELISA 法あるいは Immunoblot 法により血清及び組換え AGP の両方を認識するものであった。これらの MAb は抗原決定基の検索に供するために精製した。組換え蛋白フラグメントを用いたエピトープ解析の結果、6 種の MAb のうち、4 種 (3C5、2G3、1B1-1、2B5-1) は C 末端領域のアミノ酸 (169-202 aa) を認識することが明らかとなった。一方、残りの 2 種 (2A4-2、2C11-6) については、Immunoblot 法ではどの AGP フラグメントにも反応しなかったため、AGP の立体構造を認識する可能性が示唆されたが、サンドイッチ ELISA による定量法の確立には至らなかった。尚、直接 ELISA 法による定量では、0.125 ~1.5 mg/mL の範囲でウシ AGP を測定することが可能となった。

### (2) マウス AGP の ELISA 法と糖鎖構造解析

マウス AGP に対する MAb については組換えマウス AGP を用いて作製した。その結果、

抗原決定基の異なる 2 種類のクローンが得られたため、biotin 化 MAb を作製し、ELISA 定量法を確立した。LPS 投与マウスに応用したところ、血清 AGP は 1.5 倍に上昇し、レクチンプルダウン解析の結果、対照群と比較して分子量のより大きな複雑な糖鎖を有する AGP が認められた。

### (3) マウス AGP の N 型糖鎖修飾が細胞外分泌に与える影響

マウス AGP には想定される 5 箇所の N-glycosylation site が存在し、5 つの糖鎖を各種欠失させた AGP 変異体を作成して細胞外分泌について検討したところ、N104 位に付加される糖鎖には、分子の細胞外放出を促進する働きがあることが示唆された。

### (4) ウシ PCT の組換え蛋白発現と MAb の作製:

ウシ PCT について、大腸菌による組換え蛋白を発現させ、精製した。この精製 PCT 融合蛋白をマウスに免疫し、抗ウシ PCT モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 5 クローン (1C11、1A8、1A3、1E12、2E4) を得た。これらの抗体のアイソタイプを確認したところ、免疫グロブリン重鎖は 1C11 が IgG1、残る 4 種が IgG2b であり、軽鎖は全て  $\kappa$  鎖であった。これらの抗体のエピトープ解析を Immunoblot 法および ELISA 法を用いて行った結果、2E4 は N 末端領域 (26-96 aa) を認識したのに対し、残る 4 種の抗体は C 末端領域 (87-143 aa) を認識した。尚、N 末端領域にはアミノ酸配列から予想されるエピトープである 69-81 aa を含み、C 末端領域には予測される 2 つのエピトープ 112-125aa、131-143aa が含まれていた。

認識するエピトープの異なる 2E4 および 1A8 について、MAb を精製し、2E4 をビオチン化することで、1A8 を捕捉抗体、2E4 を検出抗体とするサンドイッチ ELISA によるウシ PCT 定量系を確立し、その検出範囲は 0.25-2 ng/ml 範囲で極めて良好な検出曲線がみられ、およそ 100 ng/ml まで測定が可能と考えられた。

(5) ウシ症例の血中急性期蛋白の測定

肺炎様症状を呈するウシ症例の血清中 PCT 濃度及びハプトグロビン(Hpt)濃度を測定した。ウシ PCT 濃度は、正常牛では検出限界以下であったが、ウシ肺炎様症例では  $34.4 \pm 84.4$  pg/ml。また、発熱継続群では寛解群と比較して有意な高値を示した。一方、Hpt は正常牛群では  $2.68 \pm 0.40$   $\mu$ g/ml であったのに対し、症例群では  $405.5 \pm 482.4$   $\mu$ g/ml と正常牛と比較して有意な高値を示した。しかしながら、発熱継続群と寛解群に有意な差はみられなかった。加えて、PCT 値と Hpt 値は相関せず、病態の違いを示すものと考えられた。

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 4 件)

Shibutani S, Okazaki H, Iwata H. Dynamin-dependent amino acid endocytosis activates mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*, 査読有, 292, 18052-18061, 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.776443.

Tsuruta Y, Shibutani ST, Watanabe R, Iwata H. The requirement of environmental acidification for Ibaraki virus infection to host cells. *J Vet Med Sci*, 査読有, 78, 153-156, 2016, doi:10.1292/jvms.15-0222.

Urata M, Watanabe R, Iwata H. The effect of glycosylation on cytotoxicity of Ibaraki virus nonstructural protein NS3. *J Vet Med Sci*, 77, 1611-1616, 2016, doi: 10.1292/jvms.15-0121.

Kato H, Gomez EA, Fujita M, Ishimaru Y, Uezato H, Mimori T, Iwata H, Hashiguchi Y. Ayadualin, a novel RGD peptide with dual antihemostatic activities from the

sand fly *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis. *Biochimie*. 112, 49-56, 2015, doi: 10.1016/j.biochi.2015.02.011.

〔学会発表〕(計 4 件)

渋谷周作, 岡崎花菜, 岩田祐之, アミノ酸/タンパク質代謝の制御因子 mTORC1 はダイナミン依存性のアミノ酸エンドサイトーシスにより活性化される, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月 6 日 ~ 9 日, 神戸ポートアイランド(神戸国際会議場, 神戸ポートピアホテル, 神戸国際展示場, 神戸商工会議所), 兵庫県神戸市

大西 慶子, 渋谷 周作, 岩田 祐之, イバラキウイルス感染における mTORC1 抑制の影響, 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017 年 9 月 13 日 ~ 15 日, 鹿児島大学, 鹿児島県鹿児島市

渋谷周作, 岡崎花菜, 岩田祐之, エンドサイトーシスによる mTORC1 活性化機構 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年 9 月 13 日 ~ 15 日, 鹿児島大学, 鹿児島県鹿児島市.

鶴田祐哉, 渋谷周作, 渡辺理恵, 岩田祐之 イバラキウイルスの哺乳動物細胞侵入経路の解析 第 159 回日本獣医学会学術集会 2016 年 09 月 06 日 ~ 2016 年 09 月 08 日 日本大学(神奈川県・藤沢市)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: mTORC1 活性化抑制剤  
発明者: 渋谷周作, 岩田祐之  
権利者: 国立大学法人山口大学

種類：発明  
番号：特願 2016-206578  
出願年月日：2016 年 10 月 21 日  
国内外の別：国内

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