

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450448

研究課題名(和文)ニワトリ血清中の新規タンパク質の構造と機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the structure and function of a novel chicken serum protein

研究代表者

松下 操 (Matsushita, Misao)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：00165812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：EW135はニワトリ卵白タンパク質であり、グループBのス캐ベンジャー受容体システインリッチ(SRCR)ドメインを9個繰り返し持つ構造をしている。以前、我々は抗EW135に結合するニワトリ血清タンパク質CS120を発見した。本研究はCS120の構造と機能の解明を目指した。我々はイオン交換クロマトグラフィーとアフィニティークロマトグラフィーを用いたCS120の精製法を開発した。cDNAクローニングにより解明された一次構造により、CS120がグループBのSRCRドメインを8個繰り返し持つことが判明した。CS120は黄色ブドウ球菌とプロテインAに結合した。一方、抗インフルエンザ活性は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：EW135 is a chicken egg white protein with 9 tandem repeats of group B scavenger receptor cysteine rich (SRCR) domain. We previously discovered a chicken serum protein named CS120 which reacts with anti-EW135 antibodies. The purpose of this project was to elucidate the structure and function of CS120. We developed a method for the purification of CS120 by using ion-exchange and affinity chromatographies. By cDNA cloning, the primary structure of CS120 has been determined. CS120 was found to consist of 8 tandem repeats of group B SRCR domain. CS120 bound to *Staphylococcus aureus* and protein A, while it did not show an anti-influenza virus activity.

研究分野：免疫学

キーワード：ニワトリ 血清 タンパク質 ス캐ベンジャー受容体システインリッチドメイン

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はニワトリ卵白中の新規タンパク質 EW135 を発見し、2013 年にその構造と機能を発表した。EW135 はグループ B のスカベンジャー受容体システインリッチ (SRCR) ドメインが 9 個から成るユニークな構造をしている。SRCR ドメインを持つタンパク質は様々な動物に存在し、主に自然免疫に働いている。EW135 は黄色ブドウ球菌とその菌体成分のタンパク質 A にカルシウム依存的に結合することから、卵の中で生体防御に機能していると推定される。研究代表者は EW135 の研究の過程で、EW135 に対する抗体に結合する分子量約 120kDa のタンパク質 (CS120) がニワトリ血清中に存在することを発見した。EW135 と同様に CS120 は黄色ブドウ球菌とタンパク質 A にカルシウム依存的に結合する。

2. 研究の目的

EW135 に対する抗体への結合性や黄色ブドウ球菌/タンパク質 A への結合性から、CS120 は EW135 と同様に SRCR ドメインを持つタンパク質であり、生体防御に働いていることが推定される。しかし、CS120 の部分アミノ酸配列が解析されているが、全構造は不明である。そこで、本研究は cDNA クローニングにより CS120 の一次構造を明らかにすることを目的とした。また、本研究では CS120 の精製法を確立し、精製 CS120 の抗ウイルス活性を検討した。

3. 研究の方法

(1) CS120 の精製

CS120 の簡便な精製法として、ウサギに免疫して作製した EW135 に対する抗体を用いるアフィニティクロマトグラフィー法を開発した。ニワトリ血清を抗 EW135 抗体 (IgG)-Sepharose カラムにアプライ後、緩衝液でカラムを洗浄し、酸性の緩衝液 (グリシン-塩酸緩衝液) を用いることにより CS120 が溶出した。

上記の代替の精製法として、ニワトリ血清のポリエチレングリコール (PEG) 4,000 沈殿、Q Sepharose と S Sepharose によるイオン交換クロマトグラフィー、タンパク質 A カラムによるアフィニティクロマトグラフィーを組み合わせた方法を検討した。

(2) CS120 の検出法 (サンドウィッチ ELISA)

抗 EW135 抗体をコートした ELISA プレートに試料を反応させた後、ビオチン標識抗 EW135 抗体、HRP 標識ビオチン-アビジン複合体を順次反応させた。その後、HRP の基質の ABTS/H₂O₂ を反応させて発色の程度を 415nm で測定した。

(3) CS120 の黄色ブドウ球菌とタンパク質 A に対する結合性

ELISA プレートにコートした精製 CS120 の Ca²⁺ または EDTA を含むトリス塩酸緩衝液で希

釈した HRP 標識タンパク質 A を反応させた後、ABTS/H₂O₂ を反応させて発色の程度を 415nm で測定した。

ホルマリン処理した黄色ブドウ球菌に Ca²⁺ または EDTA を含むトリス塩酸緩衝液で希釈した CS120 を反応させた。その後、ビオチン標識抗 EW135 抗体、HRP 標識ビオチン-アビジン複合体、ABTS/H₂O₂ を反応させて発色の程度を 415nm で測定した。

(4) CS120 の cDNA クローニング

CS120cDNA の内部配列の解析

EW135 は輸卵管で産生されるが、RT-PCR の結果から肝臓で EW135 と類似構造を持つタンパク質が産生されており、これが CS120 と推定された。また、EW135 のホモロジー検索の結果、ニワトリのゲノム解析の結果データベースに登録されている XP_424435 がヒットした。そこでニワトリ肝臓の cDNA を鋳型にして、EW135cDNA の翻訳領域の塩基配列および XP_424435 の cDNA の塩基配列 (XM_424435) を基に設計したプライマーを用いて PCR を行った。その後、PCR 産物をクローニングベクター (pGEM-T easy) に組み込み、大腸菌の形質転換を行なった。クローニングにより得られたベクター内の cDNA の塩基配列を解析した。

CS120cDNA の 5' 側の解析

XM_424435 の非翻訳領域の塩基配列とゲノム配列を基にフォワードプライマーを設計した。一方、CS120cDNA の内部の翻訳領域の塩基配列を基にリバースプライマーを設計し、これらのプライマーを用いて PCR、それに続くクローニングを行い CS120cDNA の非翻訳領域を含む 5' 側の塩基配列を解析した。

CS120cDNA の 3' 側の解析

上記の解析で得られた CS120cDNA の内部の塩基配列を基にフォワードプライマーを設計し、市販のキットを用いて 3' RACE 法を行い、CS120cDNA の 3' 側の非翻訳領域を含む塩基配列を解析した。

(5) CS120 の抗インフルエンザウイルス活性

インフルエンザウイルス (H3N2) と CS120 を混合後、MDCK 細胞に加えて 37 °C、30 分間インキュベートした。洗浄後、アガロースを含む MEM を細胞表面に重層し更に 2 日間インキュベートして形成するプラーク数を計測した。

4. 研究成果

(1) CS120 の精製

ニワトリ血清を直接抗 EW135 抗体-Sepharose にアプライ後、グリシン塩酸緩衝液により CS120 が溶出した。このアフィニティクロマトグラフィーにより CS120 は特異的に精製されることが判明した。しかし、本精製法では収率が良くなく、代替の精製法を検討した。代替法では、まずニワトリ血清を PEG4,000 で分画し、得られた 12%PEG

沈殿を Q Sepharose にアプライしてイオン交換クロマトグラフィーを行った。抗 EW135 抗体を用いたサンドウィッチ ELISA により CS120 を検出したところ、0.2 M NaCl 付近の画分に CS120 が含まれていた。そこで、これらの画分をプールし S Sepharose にアプライした。このイオン交換クロマトグラフィーでは非吸着画分に CS120 が含まれていた。最後に、これを抗 EW135 抗体-Sepharose にアプライしてアフィニティクロマトグラフィーを行い CS120 を得た。本法で精製した CS120 は電気泳動で確認すると高純度であり、また収率も EW135 抗体-Sepharose のみの精製法よりも良いことが判明した。

(2) CS120 の黄色ブドウ球菌とプロテイン A に対する結合性

CS120 の黄色ブドウ球菌と、その菌体成分のプロテイン A に対する結合性を ELISA により検討したところ、いずれに対しても CS120 は Ca イオン存在下結合したが、EDTA 存在下では結合しなかった。

(3) CS120 の cDNA クローニング

CS120cDNA の内部配列の解析の目的で設計したプライマーを用いて、ニワトリ肝臓 cDNA を鋳型に PCR を行った。その結果、約 3kbp の PCR 産物が得られた。次に、この PCR 産物と pGEM-T easy とのライゲーション、大腸菌の形質転換を行った。形成したコロニーを一つ選択し、プラスミドのシーケンス解析を行ったところ、PCR 産物が挿入されていることが確認された。シーケンシングにより PCR 産物の全塩基配列を決定した。その結果、演繹のアミノ酸配列は EW135 と極めて類似しており、8 個の SRCR ドメインを持つことが判明した。

次に、CS120cDNA の 5' 側領域の塩基配列の解析を行った。内部配列、XM_424435 及びゲノム配列を参考にして設計したプライマーを用い、ニワトリ肝臓 cDNA を鋳型にして PCR を行ったところ、約 350bp の PCR 産物が得られた。そこで、この PCR 産物と pGEM-T easy とのライゲーション、大腸菌の形質転換を行った。形成したコロニーを選択し、プラスミドのシーケンス解析を行った結果、目的の配列は検出されなかった。そこで、約 350bp の PCR 産物を鋳型として 2nd PCR を行った後、ライゲーションと形質転換を行った。形成したコロニーを選択し、プラスミドのシーケンス解析を行った結果、CS120cDNA の 5' 側の非翻訳領域と翻訳領域の一部の塩基配列が明らかになった。

CS120cDNA の 3' 側は RACE 法により解析した。CS120cDNA の内部の塩基配列を基にフォワードプライマーを設計し、市販のキットを用いて 3' RACE を行った。得られた PCR 産物のシーケンシングの結果、終止コドンを含む翻訳領域の一部と 3' 側の非翻訳領域の配

列が明らかになった。

以上の cDNA クローニングの結果、CS120 の一次構造が解明された。CS120 は 886 アミノ酸から構成され、SignalP を基に推定されるシグナルペプチドは 19 アミノ酸残基であるが、実際に 20 番目以降のアミノ酸配列は、ニワトリ血清より精製解析された CS120 の N 末端アミノ酸配列と完全に一致した。CS120 はグループ B の SRCR ドメインが 8 個タンデムに並んだユニークな構造をしている。9 個のグループ B の SRCR ドメインから成る EW135 と相同性が高い。これら二つのタンパク質のドメインを比較すると、CS120 の 1 から 8 番目の各ドメインは、EW135 の 2 から 9 番目の各ドメインとそれぞれ相同性が特に高い。

(4) CS120 の抗インフルエンザウイルス活性

CS120 とインフルエンザウイルスの H3N2 株をプレインキュベート後に MDCK 細胞に加えて形成するプラーク数を検討したところ、CS120 無しの対照と比較して顕著な減少は認められなかった。インフルエンザウイルスを H1N1pdm 株にして同様の実験を行っても CS120 の効果は見られなかった。

本研究により、ニワトリ血清中の新規タンパク質 CS120 の精製法が確立された。また、CS120 の一次構造が解明され、これがニワトリ卵白タンパク質の EW135 と同様にグループ B の SRCR ドメインが複数から成る構造をしており、両タンパク質に密接な関係があることが判明した。今後、CS120 の機能の解明が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1 Kasperkiewicz K, Eppa Ł, Świerczko AS, Bartłomiejczyk MA, Żuber ZM, Siniewicz-Luzeńczyk K, Mężyk E, Matsushita M, Bąk-Romaniszyn L, Zeman K, Skurnik M, Cedzyński M. Lectin pathway factors in patients suffering from juvenile idiopathic arthritis, *Immunol Cell Biol*, 査読有, 印刷中, 2017, doi: 10.1038/icb.2017.31.

2 Tateishi K, Imaoka M, Matsushita M. Dual modulating functions of thrombomodulin in the alternative complement pathway. *BioSci Trends*, 査読有, vol.10, 2016, 231-234, doi: 10.5582/bst.2016.01052.

3 Goshima M, Sekiguchi R, Matsushita M, Nonaka M, The complement system of elasmobranchs revealed by liver transcriptome analysis of a hammerhead shark, *Sphyrna zygaena*. *Dev Comp Immunol*, 査読有, vol.61, 2016, 13-24, doi: 10.1016/j.dci.2016.03.009.

4 Świerzko AS, Szala-Poździej A, Kilpatrick DC, Sobociński M, Chojnacka K, Sokołowska A, Michalski M, Mazerant K, Jensenius JC, Matsushita M, Krajewski WR, Szczapa J, Bąk-Romaniszyn L, Zeman K, Cedzyński M. Components of the lectin pathway of complement activation in paediatric patients of intensive care units, *Immunobiology*, 査読有, vol.221, 2016, 657-669, doi: 10.1016/j.imbio.2016.01.003.

5 Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M. TMRSS2 independency for haemagglutinin cleavage in vivo differentiates influenza B virus from influenza A virus. *Sci Rep*, 査読有, vol. 8, 2016, 29430, doi: 10.1038/srep29430.

6 Murayama A.M, Kakuta S, Inoue A, Umeda N, Yonezawa T, Maruhashi T, Tateishi K, Ishigame H, Yabe R, Ikeda S, Seno A, Chi H-H, Hashiguchi Y, Kurata R, Tada T, Kubo S, Sato N, Liu Y, Hattori M, Saijo S, Matsushita M, Fujita T, Sumida T, Iwakura Y, CTRP6 is an endogenous complement regulator that can effectively treat induced arthritis, *Nat Commun*, 査読有, vol.6, 2015, 8483, doi: 10.1038/ncomms9483.

7 Chalmers JD, Matsushita M, Kilpatrick DC, Hill AT, No strong relationship between components of the lectin pathway of complement and susceptibility to Pulmonary Tuberculosis, Inflammation, 査読有, vol. 38, 2015, 1731-1737, doi: 10.1007/s10753-015-0150-0.

8 Endo Y., Matsushita M, Fujita T, New insights into the role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity, *Int Rev Cell Mol Biol*, 査読有, vol. 316, 2015, 49-110, doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.01.003.

9 Aina A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro M, Asanuma H. Host adaptation and the alteration of viral properties of the first influenza A/H1N1pdm09 virus isolated in Japan. *Plos One*, 査読有, vol.10, 2015, e0130208, doi: 10.1371/journal.pone.0130208.

〔学会発表〕(計4件)

1 立石恒一郎、浅沼秀樹、松下 操、 Isolation and characterization of ferret microfibril-associated glycoprotein 4, 第45回日本免疫学会、2016年12月5日～7日、沖縄県・宜野湾市

2 Baba Y, Ono C, Sekiguchi R, Tateishi K, Morita Y, Nonaka M, Matsushita M, Molecular and functional characterization of guinea pig mannose-binding lectin, XXVIth International Complement Workshop, 2016年9月4日～8日、石川県・金沢市

3 Yoo W, Tateishi K, Matsushita M, EW135, a chicken egg white protein with group B scavenger receptor cysteine-rich domains, binds to *Staphylococcus aureus* and Protein A, 5th European Veterinary Immunology Workshop, 2015年9月2日～4日 オーストリア・ウィーン

4 五島正幸、関口玲生、松下 操、野中 勝、RNAseq法によるシロシモクザメの補体系遺伝子の網羅的解析、第52回日本補体学会学術集会、2015年8月21日、22日 愛知県・名古屋市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 操 (MATSUSHITA, Misao)
東海大学・工学部・教授
研究者番号：00165812

(2) 研究分担者

浅沼 秀樹 (ASANUMA, Hideki)
国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・室長
研究者番号：40333570