

遺伝子組換えニワトリの
取得効率化と糖鎖制御に関する研究

Improvement of transgenic
technology in chicken and
control of sugar modification of
protein products

木溪 俊介

目次

第1章

概論	4
参考文献	10
図表	13

第2章

インターフェロン誘導性膜タンパク質の発現とウイルス感染防御に関する役割

緒言	17
実験材料及び手法	19
実験結果	24
考察	28
参考文献	31
図表	33
謝辞	49

第3章

O-型糖鎖生合成に関わるニワトリシアル酸転移酵素の解析

緒言	51
実験材料及び手法	53
実験結果	56
考察	59
参考文献	62
図表	66

謝辭 82

第 4 章

結言 84

発表論文 86

謝辭 87

第 1 章

ヒトと疾患・病原体との関わり

ヒトは古来より都市及び国家と言った文化的にまとまった集団を形成して生活を営み、その長きにわたる過程で得た知見・経験は自らの身を疾病から守る医療技術を生み出した。文化の成熟に伴って近年では医療技術も目覚ましい進歩を遂げ、日本では昭和 22 年時点に男性で 50.06 歳、女性で 53.96 歳であった平均寿命は、平成 27 年時点では男性で 80.79 歳、女性では 87.05 歳まで延伸した^[1]。その一方で、健康に生活できる寿命として知られる健康寿命と平均寿命との開きが問題となっており、平成 22 年時点には男性で 9.13 年、女性では 12.68 年の開きがあることが報告されている^[2]。その理由として、長期の治療が必要である悪性新生物や循環器系の疾患による死因の割合が増加していることが挙げられ、健康寿命の延伸のためにも画期的な治療薬の開発が期待されている。これらの疾患は従来の低分子医薬品では治療困難な分野（アンメットメディカルニーズ）であったが、近年盛んに研究開発が行なわれているバイオ医薬品を用いた治療法の提案により必ずしも不治の病ではなくなろうとしており、今後もターゲットとなる因子特異的かつ副作用の少ないバイオ医薬品の開発と、完全な翻訳後修飾をほどこされた生体内に存在するものと同じ構造を持った医薬品の安価な大量生産法が求められている^[3]。

人類が生活する上で懸念すべき事項は疾患だけにとどまらない。我々の生活環境には一般に病原体と呼ばれる細菌・真菌・寄生虫・ウイルスが溢れており、衛生環境の悪化のみならず、グローバル化や戦争による国境を越えた人的移動が起こるたびに蔓延する感染症と文字通り「死闘」を繰り広げてきた。有名なものでは中世ヨーロッパでのペスト流行が挙げられ、一説ではヨーロッパ全土で推定 5000 万人が命を落としたと言われている。また、インフルエンザは 20 世紀に入ってからスペイン風邪・アジア風邪・香港風邪・ソ連風邪と合計 4 回の大流行（パンデミック）を引き起こし、多くの感染者・死者を出した。中でも第一次世界大戦真っ只中で発生したスペイン風邪では患者数 6 億人で推定 4000 万人の命が奪われたとされており^[4]、インフルエンザが第一次世界大戦終結を早めたのではないかと考えられているほどである。感染症の蔓延は人類にとって大きな懸念事項であったことから、近代に入ってから病原体への対抗策として特効薬の開発、量産が試みられた。その先駆けとなったのが、1928 年に英国のアレクサンダー・フレミングにより発見された抗生物質ペニシリンで

(日本には 1943 年にドイツから帰国した伊号第 8 潜水艦により情報がもたらされたとも言われている)、ここから始まった抗菌薬は今や様々な作用機序のものが上市されている。一方、ウイルスに対する特効薬はあまり上市されておらず、人類が持ちうる唯一と言って良い武器がワクチンである。その始まりは 1796 年英国のエドワード・ジェンナーによる牛痘接種で、天然痘ウイルスに対する人類の反撃の第一歩であった。これにより当時猛威を振るっていた天然痘は次第に駆逐されていき、結果として 1980 年 WHO が天然痘撲滅宣言を行って人類にとって初の対ウイルス戦勝利を飾ることができるなどワクチン接種の効果は絶大であった。現在でもインフルエンザ、麻疹、結核や狂犬病といった様々なウイルスに対する有効な防衛策としてワクチンの生産が行われており、特にインフルエンザウイルスに関しては流行が予想される型についてあらかじめワクチンの生産を行うなどの手段が講じられている。

このように、現代の医療技術は医薬品やワクチンの恩恵なしには語る事ができず、その安定的供給を目的とした安価な大量生産法の開発は医療技術の進歩にとって非常に重要であると言える。

バイオ医薬品生産の現状と課題

現在、医薬品市場は低分子医薬品に加えて抗体医薬品などのバイオ医薬品が売上上位を占めるようになってきている。2014 年時点では世界売上上位 10 品目中 7 品目がバイオ医薬品で、リウマチや癌に対しても抗体を用いた治療が提案されている⁵⁾。しかし、バイオ医薬品を広く治療法として確立するためには解決すべき課題が多く残されており、特筆すべきはそのコストである。最近上市された抗がん剤オプジーボを例にとると、2 週間間隔・投与目安 3 mg/kg に対して、薬価は約 72 万円 (/100 mg) と著しく高価である。私 (体重 80 kg) が仮に治療を受けた場合、ひと月あたり約 350 万円、1 年間で約 4200 万円という高額な医療費が発生し、患者本人の負担はもちろんのこと国家社会保障費への影響も大きいことが懸念されている。

バイオ医薬品が高額な理由としてバイオ医薬品の安定生産・精製が困難であることが挙げられ、より安価な生産技術を開発することが患者に多大な負担を強いる事なくバイオ医薬品による治療を行うための必要条件であると言える。既存生産技術は培養タンクを用いた遺伝子組換え CHO 細胞 (チャイニーズハ

ムスター卵巢癌由来) の培養であるが、コストが高額となる理由としてバイオリアクターの維持管理や培養に伴う培地の大量消費が挙げられる。そこで当研究室では、鶏卵中に有用タンパク質を生産させることで既存法の持つ難点を克服しつつ効率的な取得が可能になると考え、遺伝子組換えニワトリの取得を目指してきた。

ニワトリを用いた医薬品およびワクチンの生産

動物に有用タンパク質を生産させる動物工場は、既存技術の難点を克服できる可能性を秘めている。まず、大量の培地が必要な培養法と比べてニワトリは飼料(エサ)代のみで生産が可能と考えられ、維持コストが安価であることが利点として挙げられる。これに加えて、古くから家禽であるため飼育方法がよく知られており、一度取得してしまえば遺伝子組換え個体の繁殖、すなわちスケールアップが容易であることが想定される。また、採卵鶏は毎日産卵するため、医薬品生産において重要なファクターである安定的な供給が可能である。

「動物工場」構想は家畜でも計画されているが、ニワトリと比べて大型で飼料消費量が多いこと、広い飼育面積が必要であることに加えて、性成熟が遅くスケールアップに時間がかかることも鑑みると、動物工場の中でもニワトリによる生産系はメリットの多い手法であると考えられる。

一方、ニワトリはワクチン生産の分野でもなくてはならない存在である。おたふく風邪や麻疹ウイルスのワクチンは孵卵 10 日目付近の胚から得られるニワトリ胚線維芽細胞にウイルス株を接種する手法で取得しており、様々なウイルスに対するワクチン生産系でニワトリが活躍している。中でも特に重要なのは、インフルエンザウイルスのワクチン生産である。現在、インフルエンザウイルスのワクチン生産には発育鶏卵を使用しており (Fig. 1-1)、孵卵 9 日目の胚にウイルスを接種して回収及び不活化することでワクチンを取得している。そのためワクチン生産には大量の無菌受精卵が必要であり、限られた発育鶏卵でいかに効率的にワクチン生産を行うかが重要である。また、ニワトリはインフルエンザウイルスの宿主ではあるもののヒトとはタンパク質の修飾糖鎖構造が異なることが知られている。ワクチン生産過程でのウイルスの変異蓄積が懸念されていることから、ニワトリの糖鎖構造を制御することも効率的なワクチン生産にとって重要である。

このようにニワトリは我々にとって食用という範疇を超えて非常に有益な家禽であり、研究対象として非常に魅力的かつ意義のあるものであると言える。

ニワトリを動物工場として用いる上での課題

ニワトリによる生産系には様々なメリットがあるが、解決すべき課題も存在する。そこで私は、課題のうち以下の2つについて解決することを目指した。

1. 遺伝子組換えニワトリ取得効率の向上
2. ニワトリにおける糖鎖修飾の解析

ニワトリによる有用タンパク質生産系を確立するためには、まず有用タンパク質を卵白中に生産できる遺伝子組換えニワトリについて、容易で安定的な取得法の確立が必要である。しかし、マウスとは異なり受精卵の操作が難しいことから遺伝子組換えニワトリの取得は困難であることが知られている。当研究室では孵卵 55 時間胚でレトロウイルスのインジェクションを行って血中を循環している始原生殖細胞に遺伝子を導入する手法を用いているが、遺伝子組換えニワトリを取得することは容易ではない。私は、遺伝子導入に用いるレトロウイルスの感染がニワトリ免疫系によって抑制されて効率の低下を招いていると考え、影響を明らかにすることを試みた。

ヒトを含め生物は、自らの持つ免疫系によりウイルスや病原細菌の感染に対して抵抗性を示す。その作用機構は大きく3つに分けられ、第1に粘膜による物理的防御、第2に自然免疫系、第3に獲得免疫系が作用する (Fig. 1-2)。このうち第1の砦である粘膜による防御は非特異的な生体防御機構^[6]で、第2、3の砦は自己と非自己の区別を行ってから攻撃する。2つの機構は互いに協調して働くものの、作用機序は異なることが知られている。自然免疫系では侵入した病原体のゲノムや菌体構成因子が有するパターン構造を TLR ファミリーや RIG-I といったパターン認識受容体 (PRR; Pattern Recognition Receptor) が非特異的に認識する^[7]のに対して、獲得免疫系では抗原提示細胞によって提示される病原体の構成因子を特異的に見分けて攻撃する。そのため、獲得免疫系は抗原を記憶して同じ病原体が侵入した際に特異的に反応できるが、自然免疫系は決まった受容体による非特異的な認識であるため免疫記憶ができないとい

う特徴を持つ。また、機能するまでに要する時間は自然免疫が数時間で応答するのに対して、獲得免疫ではエフェクター細胞の分裂（クローン増殖）がおこるため数週間のタイムラグが存在することが知られている^[8]。加えて、獲得免疫は後天的な病原体特異的認識機構であるのに対して自然免疫は先天的な機構であり、我々がターゲットとしている未分化な始原生殖細胞でも自然免疫は機能している可能性がある。そこで、私はニワトリにおける自然免疫機構に着目して解析を行った。

ウイルス感染に対する自然免疫機構ではインターフェロン（IFN）が重要な役割を果たす^[9]。守護者としての抗ウイルス因子の多くは IFN によって誘導されることが知られており、例としてウイルス RNA の合成を阻害する 2', 5'-オリゴアデニル酸合成酵素（OAS）/ RNaseL システム、ウイルスタンパク質の合成を阻害するプロテインキナーゼ R（PKR）、Mx などが挙げられる^[10]。一方、侵略者であるウイルスの感染には、ターゲットとなる細胞膜との融合が非常に重要なステップとなる^[11, 12]。融合段階は 2 つのタイプに分類され、インフルエンザウイルスや水疱性口内炎ウイルス VSV のような pH 依存的膜融合タイプのウイルスと麻疹ウイルスやレトロウイルスのような pH 非依存的膜融合タイプのウイルスに大別される^[13, 14]。このうち、pH 依存的な膜融合を利用するウイルスは主としてエンドソームを仲介して感染が進行し、リソソームと融合したエンドリソソームから融合が始まることが報告されているため、私は自然免疫系に関与する因子の中でも特に、エンドソーム膜に局在してウイルスとの膜融合を阻害する因子 IFITM (interferon-inducible transmembrane protein) に着目した。

哺乳類においては、IFITM は IFN により誘導される因子であることが知られ^[15]、強い抗ウイルス活性が報告されている^[16]。インフルエンザウイルスだけでなくフィロウイルスや SARS コロナウイルス、VSV やヒト免疫不全ウイルス HIV-1 と言った様々なウイルスに対しても阻害活性を持ち^[17-21]、抗ウイルスメカニズムとして膜融合の効率を下げることによるウイルスの細胞質侵入の阻害が推定される^[22, 23] (Fig. 1-3)。このため、当研究室で使用している VSV-G エンベロープでシュードタイプ化したレトロウイルスの感染に対して内在のニワトリ IFITM が感染阻害に関与している可能性は否定できない。我々が目的とする遺伝子組換えニワトリの取得及びワクチン生産効率の上昇にはウイルスの感染ステップが非常に重要なポイントであり、ウイルス感染を適切に制御す

ることで取得効率が上昇すると想定されるため、まずは第 2 章でニワトリ抗ウイルス因子 IFITM について解析を行った。

糖鎖構造は、修飾されるタンパク質の挙動の制御に加えてウイルス感染にも重要な役割を果たしている。細胞表面はウイルス吸着の場として非常に重要で、デングウイルスやセンダイウイルスなど様々なウイルスが糖鎖構造を認識して相互作用する^[24-28]。中でもインフルエンザウイルスは細胞表面シアル酸の結合様式を認識して感染が進行し、ヒト型インフルエンザウイルスはヒトに多い $\alpha 2,6$ 結合のシアル酸を、トリ型インフルエンザウイルスはニワトリに多い $\alpha 2,3$ 結合のシアル酸を認識することが知られている^[29]。鶏卵を用いたワクチン生産系ではこの糖鎖構造の違いが問題となっており、ヒトインフルエンザウイルスを鶏卵に感染させても培養していくうちに馴化してしまうことで効果的なワクチン取得ができなくなる懸念がある^[30, 31]。また、生体内で働く有用タンパク質は糖鎖修飾を行わなければ十分生理機能を発揮できないため、鶏卵を用いて効率良く高性能のタンパク質取得を行う際には、親であるニワトリ個体の糖鎖修飾制御を理解しておく必要がある。このように、効率的なワクチン生産や有用タンパク質生産には糖鎖修飾酵素の解析は必須であるため、第 3 章では以前当研究室で解析していた *N* 型糖鎖に関連するシアル酸転移酵素 *ST* に引き続き、*O* 型糖鎖構造にシアル酸を転移する *ST* についても広範な基質を用いてその性質の解析を試みた。

参考文献

- [1] 厚生労働省, 平成 27 年簡易生命表の概況
- [2] 橋本修二, 川戸美由紀, & 尾島俊之. (2013). 健康寿命における将来予測と生活習慣病対策の費用対効果に関する研究.
- [3] 松崎淳一. (2013). バイオ医薬品産業の現状と課題. *生物工学*, *91*, 495-498
- [4] 池田一夫, 藤谷和正, 灘岡陽子, 神谷信行, 広門雅子, & 柳川義勢. (2005). 日本におけるスペインかぜの精密分析. *東京都健康安全研究センター研究年報*, *56*, 369-374
- [5] 厚生労働省. (2015). 医薬品産業強化総合戦略~ グローバル展開を見据えた創薬~. *政策特報*, (1486), 64-89.
- [6] Voynow, J. A., & Rubin, B. K. (2009). Mucins, mucus, and sputum. *CHEST Journal*, *135*(2), 505-512.
- [7] Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, *140*(6), 805-820.
- [8] Peter Parham. (2013). エッセンシャル免疫学 第二版, 株式会社メディカル・サイエンス・インターナショナル
- [9] 米山光俊, & 藤田尚志. (2004). 1. ウイルス感染に応答した I 型インターフェロン遺伝子の発現誘導メカニズム. *ウイルス*, *54*(2), 161-168.
- [10] Sadler, A. J., & Williams, B. R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology*, *8*(7), 559-568.
- [11] Harrison, S. C. (2008). Viral membrane fusion. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(7), 690-698.
- [12] 宮内浩典. (2009). エンベロープウイルスの宿主細胞への侵入過程. *ウイルス*, *59*(2), 205-214.
- [13] 鶴留雅人. (2005). ウイルスによる膜融合. *ウイルス*, *55*(2), 207-219.
- [14] 吉村哲郎. (1991). 蛋白質と膜融合 (生理活性物質の膜作用< 特集>). *蛋白質核酸酵素*, *36*(11), 1797-1807.
- [15] Friedman, R. L., Manly, S. P., McMahon, M., Kerr, I. M., & Stark, G. R. (1984). Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell*, *38*(3), 745-755.
- [16] Diamond, M. S., & Farzan, M. (2013). The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nature Reviews Immunology*, *13*(1),

46-57.

[17] Huang, I. C., Bailey, C. C., Weyer, J. L., Radoshitzky, S. R., Becker, M. M., Chiang, J. J., et al. (2011). Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathogens*, 7(1), e1001258.

[18] Weidner, J. M., Jiang, D., Pan, X. B., Chang, J., Block, T. M., & Guo, J. T. (2010). Interferon-induced cell membrane proteins, IFITM3 and tetherin, inhibit vesicular stomatitis virus infection via distinct mechanisms. *Journal of Virology*, 84(24), 12646-12657.

[19] Lu, J., Pan, Q., Rong, L., Liu, S. L., & Liang, C. (2011). The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. *Journal of Virology*, 85(5), 2126-2137.

[20] Brass, A. L., Huang, I. C., Benita, Y., John, S. P., Krishnan, M. N., Feeley, E. M., et al. (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell*, 139(7), 1243-1254.

[21] Bailey, C. C., Huang, I. C., Kam, C., & Farzan, M. (2012). Ifitm3 limits the severity of acute influenza in mice. *PLoS Pathogens*, 8(9), e1002909.

[22] Li, K., Markosyan, R. M., Zheng, Y. M., Golfetto, O., Bungart, B., Li, M., et al. (2013). IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003124.

[23] Feeley, E. M., Sims, J. S., John, S. P., Chin, C. R., Pertel, T., Chen, L. M., et al. (2011). IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry. *PLoS Pathogens*, 7(10), e1002337.

[24] 左一八, & 鈴木隆. (2010). デングウイルス感染に関わる糖鎖分子の構造と機能. *生化学*, 82(8), 751-755.

[25] Markwell, M. A., Svennerholm, L., & Paulson, J. C. (1981). Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(9), 5406-5410.

[26] Johnson, F. B., Fenn, L. B., Owens, T. J., Faucheux, L. J., & Blackburn, S. D. (2004). Attachment of bovine parvovirus to sialic acids on bovine cell membranes. *Journal of General Virology*, 85(8), 2199-2207.

[27] Guglielmi, K. M., Johnson, E. M., Stehle, T., & Dermody, T. S. (2006). Attachment and cell entry of mammalian orthoreovirus. *Reoviruses: Entry*,

Assembly and Morphogenesis, Springer Berlin Heidelberg, 1-38

[28] Alfsen, A., & Bomsel, M. (2002). HIV-1 gp41 envelope residues 650–685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25649-25659.

[29] Yen, H. L., & Peiris, J. S. M. (2012). Virology: bird flu in mammals. *Nature*, 486(7403), 332-333.

[30] Skowronski, D. M., Janjua, N. Z., De Serres, G., Sabaiduc, S., Eshaghi, A., Dickinson, J. A., et al. (2014). Low 2012–13 Influenza Vaccine Effectiveness Associated with Mutation in the Egg-Adapted H3N2 Vaccine Strain Not Antigenic Drift in Circulating Viruses. *PloS one*, 9(3), e92153.

[31] Skowronski, D. M., Chambers, C., Sabaiduc, S., De Serres, G., Dickinson, J. A., Winter, A. L., et al. (2015). Interim estimates of 2014/15 vaccine effectiveness against influenza A (H3N2) from Canada's Sentinel Physician Surveillance Network, January 2015. *Euro Surveill*, 20(4), 1-18

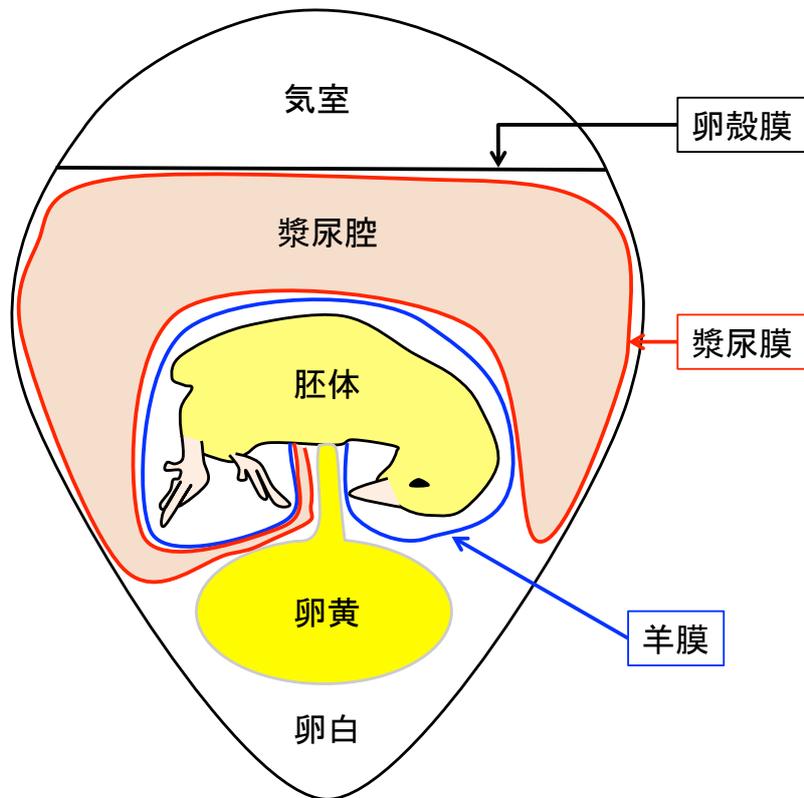


Fig. 1-1

発育鶏卵を用いたインフルエンザウイルスのワクチン取得法

インフルエンザウイルスのワクチン取得には孵卵9日目の発育鶏卵が使用されている。赤色で囲った漿尿腔へウイルス株を接種し、2日後に中の漿尿液を回収してから不活化処理をおこなうか、部分精製する事によりワクチンを得る。この手法では大量の無菌的受精卵が必要であるため、効率的なワクチン生産法が求められている。

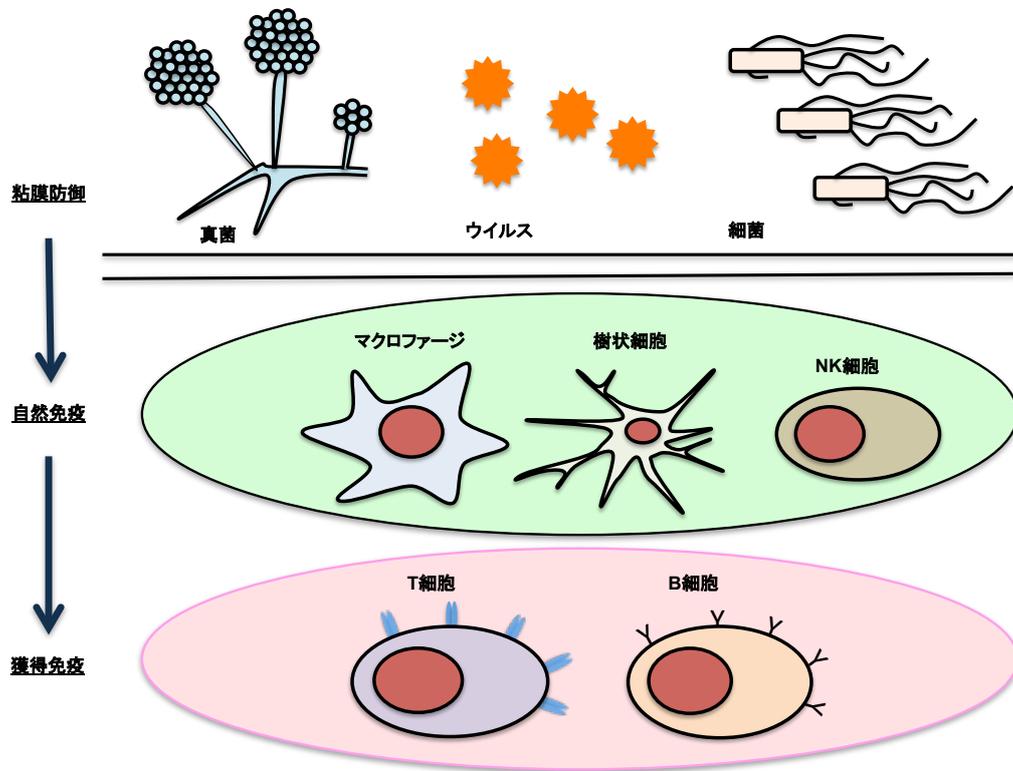


Fig. 1-2

生体における防御機構

ウイルスや細菌などの病原体に対しては、第1の砦として粘膜による機械的バリアーが侵入を防いでいる。粘膜に損傷があって病原体の侵入を許した場合、第2の砦として自然免疫機構が働いて病原体の排除を行う。感染が進行し自然免疫では対処不能となった場合は、最後の砦として獲得免疫系が作用する。これら免疫機構の働きにより、我々の身体の恒常性は保たれている。

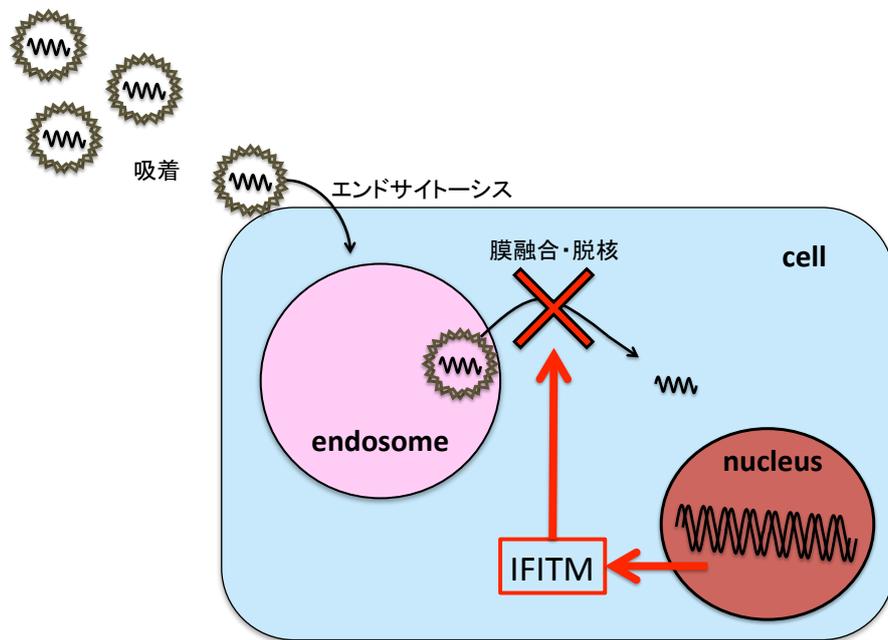


Fig. 1-3

ウイルスの感染機構と IFITM による感染阻害

ウイルス感染の初期段階は、吸着・取り込み・膜融合・脱核という4つの重要なステップを経て進行する。このうちエンドソームから感染するウイルスには、膜融合の過程で pH が低下することが重要となるインフルエンザウイルスのようなウイルスも存在する。抗ウイルス因子である IFITM は定常状態でもある程度発現しており、ウイルスエンベロープとエンドソーム膜の融合を阻害することでウイルスの感染を抑制されている。

第 2 章

インターフェロン誘導性 膜タンパク質の発現と ウイルス感染防御に関する役割

緒言

IFITM (InterFeron-Inducible TransMembrane protein) ファミリータンパク質はA型インフルエンザウイルスやエボラウイルスを含め様々な病原ウイルスの複製を阻害することが知られており、哺乳類では研究が進んでいる。ヒトにおいては IFITM1, 2, 3, 5, 10、マウスでは IFITM1, 2, 3, 5, 6 のそれぞれ5種類が存在すると報告されており^[1,2]、その作用点はエンドサイトーシスの後に起こるウイルスと宿主の細胞膜融合の阻害であると考えられている。中でも、IFITM3 は後期末ソームにおいて様々なウイルス感染を抑制することが知られており、インフルエンザウイルス、西ナイル熱ウイルス、黄熱病ウイルスと広範囲にわたるウイルスが対象である^[2]。

最近の研究ではニワトリにおいても哺乳類と同様 (Fig. 2-1~4) の IFITM のオルソログが発見され、*in vitro* ではあるがインフルエンザウイルスやリッサウイルスの感染を阻害することが明らかとなった^[3]。世界中、特にアジア地域ではニワトリに感染する A 型インフルエンザウイルス (いわゆる鳥インフルエンザウイルス) の流行が非常に深刻な問題となっており、わずかではあるもののニワトリからヒトへの異種間感染も報告されている。パンデミックを引き起こさないためには、ニワトリインフルエンザの蔓延を解消することが重要で、ニワトリ個体における抗インフルエンザ因子の機能解析が待たれている。加えて、鶏卵は現在インフルエンザ等のワクチン生産に必要な素材となっていることから、効率的なワクチン生産に向けてウイルス感染を制御する IFITM の研究を行う重要性は非常に高まっている。

さらに、IFITM はウイルスの感染を制御する因子であることから、当研究室で取得している遺伝子組換えニワトリ作製時にも影響を及ぼしている可能性がある。遺伝子組換え技術には様々な手法が知られており、現在までに有用な生理活性物質を生産する家畜 (動物工場) が取得されてきた^[4-6]。ニワトリにおいては当研究室で取得法が確立されており、水疱性口内炎ウイルス VSV (Vesicular Stomatitis Virus) のエンベロープ G タンパク質でシェードタイプ化したレトロウイルスベクターが広く用いられている^[7]。この手法では組換えウイルスベクターをブラストダーム期胚もしくは発生 2.5 日胚の心臓にインジェクションし感染させることで遺伝子組換えを行う^[8-11]が、一般的に G1 遺伝子組換えニワトリが取得できる可能性は大変低い。哺乳類では VSV の感染が

IFITMにより阻害されることが報告されている^[12]ため、ニワトリ宿主側がウイルスベクターの感染を阻害していることが想定される。

遺伝子組換えニワトリを動物工場として用いるためには、人工的に繁殖可能であることが重要で、将来精子や卵子に分化する始原生殖細胞 PGC (Primordial Germ Cell) に遺伝子を導入することが求められる。ニワトリの場合、PGC はステージ X ブラストダームの明帯から出現し、胚発生の過程が進むにつれて胚血中循環期を経て生殖隆起部に定着するという特徴を持つ^[12]。我々がウイルスインジェクションのターゲットとしている孵卵 2.5 日目の胚は PGC が胚血中を循環している時期であるため、前述したような遺伝子組換えニワトリの取得率が低い理由として、cPGC への感染効率が低いことが可能性として考えられる。

この章では、まずエンドソームを介して感染するウイルスを阻害する IFITM について、ニワトリの成鳥と胚で発現の解析を行った。さらに、PGC においてニワトリ IFITM が及ぼす組換えウイルスベクター感染への影響を明らかにするため、cPGC での IFITM3 発現レベルと同程度の IFITM3 を発現するセルラインを用いて VSV-G シュードタイプウイルスの感染を行い、その効果を明らかにした。さらに、ウイルスワクチン生産の素材として用いられる鶏卵のうち、ウイルス増殖の足場となる漿尿膜及び羊膜について IFITM 発現レベルを解析した。

実験材料及び手法

試薬及び細胞

ニワトリインターフェロン (IFN; interferon) - α は、Abcam (Cambridge, UK) より購入した。抗 SSEA-1 (anti-stage-specific embryonic antigen-1) 抗体及び FITC (fluorescence isothiocyanate) によりラベルされたウサギ抗ヤギ IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 製品を使用した。また、PE (phycoerythrin) によりラベルされたヤギ抗マウス IgM 抗体は Rockland (Gilbertsville, PA, USA) 製品を使用した。

ニワトリ胚線維芽細胞株 DF-1 (CRL-12203) は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) より購入した。DF-1 細胞の培養には、10%のウシ胎児血清 (FBS; Fetal Bovine Serum, Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) に加え、抗生物質として 100 U/mL のペニシリン G カリウム及び 100 μ g/mL のストレプトマイシン硫酸塩を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培地 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いた (Table 2-1)。また、レトロウイルス産生にはヒト胎児腎癌由来 293FT 細胞を使用し、培養にはピルビン酸ナトリウム (和光純薬, 大阪, 日本)、非必須アミノ酸 NEAA (和光純薬) 及び HEPES (同仁化学研究所, 熊本, 日本) を添加した DMEM-293 培地 (Table 2-1) を用いた。得られたウイルスの力価測定にはヒト子宮頸癌由来 Hela 細胞を使用し、培地として DMEM 培地を用いた。

ニワトリ成鳥、鶏卵

白色レグホン種の受精卵は日生研 (山梨, 日本)、竹内孵卵場 (奈良, 日本)、及び当研究室で採卵した自家製卵を使用した。ニワトリ胚線維芽細胞 CEF (Chicken Embryonic Fibroblast) は、38°C で 10 日間転卵したこれらの受精卵からトリプシン法にて取得した。CEF も DF-1 と同じく 10% FBS と抗生物質を含む DMEM 培地で培養し、2 もしくは 3 回の継代を行ってから実験に使用した。

組織の取得

発現確認に用いた組織は、当研究室で飼育しているニワトリ成鳥及び孵卵 5.5 日胚を解剖し採取した。また、羊膜及び漿尿膜（前章 Fig. 1-1 を参照）は孵卵 9 日目胚から取得した。さらに、特定病原菌非感染（SPF; specific pathogen free）ニワトリとして稲吉勇仁氏（日生研）から白色レグホン種の組織を提供していただいた。取得した組織は細かく切断した後リン酸緩衝液（PBS）で洗浄し、ISOGEN II（ニッポンジーン，東京，日本）を用いて全 RNA の抽出を行った。なお、全ての動物実験は名古屋大学動物実験委員会の定める倫理指針に則って行った。

PGC の単離

ニワトリ受精卵を温度 38℃、湿度 65%で転卵し、転卵後 55 時間（Hamburger-Hamilton stage^[13] 13-16）、3.5 日（stage 17-19）、5.5 日（stage 27-28）をそれぞれ cPGC（circulating PGC）、grPGC（genital ridge PGC）、gPGC（gonadal PGC）の取得源とした。cPGC の取得では胚血管にガラス針を刺して血液を抜き取り、0.5% FBS を含む PBS で細胞を洗った。grPGC、gPGC の取得では、それぞれ生殖隆起部及び生殖腺を採取し、0.1% トリプシンと 0.02% EDTA で細胞を分散させた。これらの血液及び生殖細胞を、一次抗体として抗 SSEA-1 抗体、二次抗体として PE ラベルしたヤギ抗マウス IgM 抗体で氷上 30 分反応させたのち、フローサイトメーター（EPICS ALTRA; Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA 及び FACS Jazz; BD Biosciences, San Jose, CA, USA）を用いて SSEA-1 陽性細胞を PGC として単離した^[14,15]。

定量リアルタイム PCR

ISOGEN II を用いて抽出した組織の全 RNA は、poly dT プライマーと ReverTra Ace（東洋紡，大阪，日本）を用いて逆転写したのち、SYBR GreenI 試薬である THUNDERBIRD qPCR Mix（東洋紡）を用いてインターカーレーター法による定量リアルタイム PCR（qRT-PCR; quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction）解析を行った。解析には、Roche

Diagnostics (Mannheim, Germany) の LightCycler 及び LightCycler96 を使用した。

取得した PGC は数が少ないため、全 RNA 抽出には ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA) を使用して全 RNA を抽出した。その後、ReverTra Ace qPCR Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用いて逆転写を行い、THUNDERBIRD qPCR Mix により qRT-PCR 解析を行った。PCR サイクル条件は以下に示した。

95 °C	60 sec		
95 °C	3 sec	←	40cycles
60 °C	10 sec		
72 °C	30 sec		

解析する遺伝子は制限酵素で切断してリニアにしたプラスミドを用いてスタンダードカーブを作成しコピー数を算出してから GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) の mRNA 量で補正を行った。また、qRT-PCR に使用したプライマーは Table 2-2 に示した。

ニワトリ IFITM2 はデータベースに登録がされておらずクローニングができなかったため、既報³⁾のプライマーを参照し、GAPDH で補正して算出した。

IFITM のクローニング

IFITM1, 3, 5 のクローニングに用いた cDNA は PGC から取得し、PCR でターゲット領域を増幅してから p3×FLAG CMV-14 ベクター (Sigma-Aldrich) に挿入した。クローニングに使用したプライマーは Table 2-3 に示した。組換えプラスミドは大腸菌 DH5α に導入し、Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) を使用して大量精製を行った。その後、制限酵素によりリニア化してから QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて精製した。処理後のリニアプラスミドの濃度及び純度は吸光度計で測定し、OD_{260/280} が 1.65~1.75 となっていることを確認してから希釈を行って qRT-PCR のコピー数スタンダードとして用いた。

IFN- α による IFITM の発現誘導

24well プレートに CEF 細胞を 1.0×10^5 (cells/well) で播種してから 24 時間後に、200 ng/ μ L で IFN- α を加えた。さらに 18 時間培養を行ったのち、ISOGEN II を用いて全 RNA を抽出した。得られた RNA は ReverTra Ace で逆転写を行い、IFITM3 の発現量を qRT-PCR により解析した。

VSV-G シュードタイプレンチウイルスの取得

レンチウイルスの生産は、基本的に以前の報告と同様に行った^[15]。コラーゲンコートした 60mm ディッシュに 293FT 細胞を 2.4×10^6 (cells/dish) で播種し、24 時間後に Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) でトランスフェクションを行った。レンチウイルスベクターとしてニワトリアクチンプロモーター駆動の eGFP 発現ベクター (pLSi/ Δ AeGFP) 3.8 μ g、gag/pol プラスミド 2.0 μ g、rev プラスミド 1.1 μ g、VSV-G プラスミド (Invitrogen) 1.1 μ g を使用した。トランスフェクション後 72 時間培養してから培養上清を回収し、DISMIC 0.22 μ m フィルター (ADVANTEC, 東京, 日本) を通して細胞残渣を取り除いた後ウイルス力価を測定した。24well プレートに播種した Hela 細胞に段階希釈したウイルスを感染させ、感染後 48 時間でフローサイトメーターを用いて eGFP 陽性細胞の比率を解析し、力価を算出した。

IFITM3 のノックダウンと感染効率の評価

ニワトリ IFITM3 のノックダウンには既報^[3]配列の siRNA (Sigma-Aldrich) を使用した。DF-1 細胞を 24well プレートに 1.25×10^4 (cells/well) で播種し、16 時間後に IFITM3 特異的 siRNA もしくはコントロール siRNA (siTrio; B-Bridge International Inc., Santa Clara, CA, USA) を Lipofectamine3000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。さらに 48 時間後、多重感染度 MOI (Multiplicity of infection) = 0.1 でレンチウイルスを感染させ、9 時間後に細胞を回収した。細胞はトリプシンで 10 分処理して細胞表面に吸着したウイルスを取り除いてから 3500 rpm、10 分遠心した後核酸を抽出した。逆転写されたウイルス DNA の抽出には、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を、mRNA の抽出には ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega) を使用した。

得られた核酸は qRT-PCR にて解析を行い、感染効率を評価した。細胞質中に存在する逆転写されたウイルス由来 eGFP 遺伝子を感染度の指標として定量し (Fig.2-5)、プラスミドによるコピー数を計算してから細胞数の指標として用いた gGAPDH (genome GAPDH) で補正した。また、同時に IFITM3 及び GAPDH の mRNA 量を定量し、ノックダウン効率を算出した。GAPDH の qRT-PCR 用プライマーはゲノム DNA 定量と mRNA 定量で同じものを使用した。増幅サイズは異なる (genome; 182bp, mRNA; 98bp) ため判別可能である。

実験結果

ニワトリ IFITM3 は、成鳥の肺で高発現している

成鳥における IFITM の発現パターンは既に論文で報告されている^[3]ものの、アガロース泳動によるバンド強度比較という半定量的なものである。そこで私は生理的条件下における IFITM の発現について、プラスミドを用いたコピー数の算出と GAPDH による補正を行うことでより正確な定量を試みた。まず、成鳥ニワトリ組織での IFITM の mRNA 量を qRT-PCR で定量した (Fig. 2-6A)。成鳥組織では IFITM3 が肺で一番高く、次いで脾臓で高い発現を示す結果が得られた。また、気道及び大腸でもある程度の IFITM3 発現が見られた。さらに、特定の組織においては IFITM3 の発現は GAPDH の発現に匹敵することが得られたコピー数の値から明らかとなり、肺では同程度、脾臓では 0.4 倍であった。IFITM2 は IFITM3 の 1/5 程度であるが様々な組織で発現している一方で、IFITM1 及び 5 は調べた組織では発現が低かった。しかし、IFITM1 のみ大腸で例外的に発現が高いという結果が示され、発現量は GAPDH の 0.4 倍であった。これらの結果から、鳥インフルエンザウイルス感染の主要ターゲットである肺では、既報^[3]で強い抗ウイルス活性を示した IFITM3 の発現が高いことが明らかとなった。一方、もう一つのターゲットである大腸では IFITM1 が主であり、次いで IFITM3 の存在量が多い。

IFITM は、その名が示す通り IFN により誘導され、IFN はウイルス感染がトリガーとなって産生される。得られた結果が IFN による IFITM 誘導後の結果ではないことを保証するため、SPF 条件下で飼育されたニワトリの組織についても IFITM の発現を解析した結果 (Fig. 2-6B)、同様の結果が得られたため、Fig. 2-6A における IFITM の発現レベルは健常なニワトリの基底発現レベルを示していることが担保できた。

ニワトリ IFITM は IFN- α により誘導される

IFN は様々な抗ウイルス因子を誘導することで抗ウイルス活性を示し、IFITM も IFN によって発現が誘導されることが哺乳類で知られている。そこで、ニワトリ IFITM についても IFN 誘導性を明らかにするために、CEF における IFITM の IFN- α 誘導性を観察した (Fig. 2-7)。10 日目胚より採取した CEF は IFN- α 非刺激の基底状態では IFITM3 及び 2 が発現しているが IFITM1

及び 5 は発現しておらず、IFITM3 の発現は GAPDH と比較すると約 4%、IFITM2 は IFITM3 の約 1/4 程度の発現量であった。この発現レベルは Fig. 2-6A で解析した成鳥組織と比べて著しく低く、後述する胚組織での発現レベルに近いことが明らかとなった。IFN- α で刺激を行うと IFITM3, 2 の発現は著しく亢進し、非刺激時と比較して IFITM3 はおよそ 13 倍、IFITM2 は 21 倍誘導された。また、IFITM1 及び IFITM5 についても誘導性は観察されたが、IFITM3 と比べると発現誘導レベルは低かった。これらの結果は、ニワトリで IFN- α が誘導する抗ウイルス活性に IFITM が関与していることを示している。

IFITM3 は胚組織及び PGC でも発現している

ニワトリ胚における IFITM の発現については、未だ報告がされていない。そこで孵卵 5.5 日胚から組織を採取し、IFITM1, 2, 3, 5 について qRT-PCR で発現量解析を行った (Fig. 2-8)。IFITM3 は生殖腺 (gonad)、腸管 (intestine) で発現が最も高く、次いで肝臓 (liver) と心臓 (heart) で高い発現を示した。IFITM2 は IFITM3 に次ぐ発現量で、生殖腺では IFITM3 のおよそ半分、肝臓及び腸管でも発現が見られたが脳での発現は低かった。一方で、IFITM1 及び 5 の発現は低かった。また、胚組織での IFITM 発現は成鳥と比べて著しく低く、最大でも成鳥の肺における IFITM3 発現量の 3%程度であった。

解析した胚組織の中では、生殖腺における IFITM3 の発現が高かった。生殖腺には始原生殖細胞 PGC (Primordial Germ Cell) が定着することが知られているため、ニワトリ PGC で解析を試みた。PGC には幾つかのステージがあり、未分化の順から cPGC (circulating PGC; 血中循環期)、grPGC (genital ridge PGC; 生殖隆起部由来)、gPGC (gonadal PGC; 生殖腺由来) を用いて解析した。それぞれの PGC について生殖腺で主要な IFITM であった IFITM3 について発現量を解析したところ (Fig. 2-9)、cPGC では IFITM3 の発現が GAPDH の 4.5%であったが、PGC の分化に伴って発現が低下し、gPGC では GAPDH に対して 1.2%程度の発現量であることが明らかとなった。

ニワトリ IFITM3 のノックダウンは、VSV-G シュードタイプ プレレンチウイルスの感染を促進する

我々が試みている遺伝子組換えニワトリの取得には PGC への遺伝子導入が

必須であるが Fig. 2-9 で明らかにした通りウイルスインジェクションのターゲットである cPGC (孵卵 55 時間、血中循環期) では IFITM3 の発現が高い。哺乳類では、IFITM3 は後期エンドソームを介して感染するウイルスを強く抑制し、IFITM1 は早期エンドソームを介するウイルスを抑制することが既に報告されている^[2]。また、ニワトリにおいては *in vitro* において IFITM3 が A 型インフルエンザウイルス及びリッサウイルスの感染を阻害することが報告されており^[3]、これらの結果はニワトリの IFITM3 も哺乳類同様に広範なウイルス感染を阻害する可能性を示唆している。生理条件下における基底レベルでの IFITM3 発現量がレンチウイルスの感染阻害に対して効果があるかは未だ明らかではないため、株化細胞である DF-1 細胞を用いて IFITM3 のノックダウンによるウイルス感染効率の解析を行った (Fig.2-10)。

DF-1 細胞は IFN 非刺激でも cPGC の約 1.5 倍の IFITM3 を発現していた。特異的 siRNA をトランスフェクションして IFITM3 のノックダウンを行うと、本来の 15%程度まで発現レベルが低下した (Fig. 2-10 上図)。これは、gPGC 相当の発現レベルである。ノックダウンした細胞に VSV-G シュードタイプの HIV-1 ウイルスを感染させたところ、ノックダウンを行っていない細胞と比較して約 1.8 倍感染効率が上昇した (Fig. 2-10 下図)。この結果から、cPGC 程度の低レベルの IFITM3 発現であっても VSV-G シュードタイプの HIV-1 ウイルスの感染を阻害する可能性が示された。

ワクチン生産に用いられる鶏卵組織では IFITM3 の発現

レベルが低い

鶏卵は様々なウイルスのワクチン生産に用いられており、例えば麻疹やおたふくかぜなどが挙げられる。中でも、インフルエンザウイルスのワクチン生産には現在のところ発育鶏卵が必須で、転卵 9 日目の卵中の漿尿腔 (前章 Fig. 1-1 参照) にウイルスを導入することでワクチンを取得している。そのため、鶏卵中では IFITM の発現が低いほうがワクチン生産効率の向上につながるが、鶏卵組織での IFITM 発現については現在まで解析されていなかったため、鶏卵中の漿尿膜及び羊膜を採取してウイルス感染を阻害する IFITM の発現を解析した (Fig. 2-11)。漿尿膜・羊膜では IFITM3 の発現は GAPDH に対して 3-4% と、cPGC よりわずかに低かった。また、IFITM2 は IFITM3 と比較して 40-50%の発現レベルで、IFITM1 及び 5 の発現は著しく低かった。これらの結果

から、胚を囲む膜である漿尿膜及び羊膜でわずかながら IFITM3 及び 2 が発現していることが示された。

考察

この章では、抗ウイルス因子の一つである IFITM について、ニワトリの胚から成鳥までの組織における基底発現レベル、及び VSV-G シュードタイプの HIV-1 ウイルスに対して IFITM が持つ抗ウイルス効果を解析した。

成鳥では、既に臓器における発現パターンについてはある程度解析されていた³が、今回の解析で、大腸を除く成鳥組織では IFN による刺激のない生理条件下で IFITM3 が主であることをより定量的に明らかにした。特に肺においてはウイルスが感染していないにもかかわらず IFITM3 の発現が高く、GAPDH と同程度であった。肺がウイルス感染のターゲットにさらされやすいことを考慮すると、抗ウイルス活性機能を持つことが示唆される IFITM3 の発現が肺で高いことは妥当である。一方で IFITM1, 2, 5 は IFITM3 と比較して発現レベルが低いことを明らかにしたが、IFITM1 は発現分布に特徴が見られ、大腸でのみ特異的に高く発現していたことは大変興味深い結果である。大腸は腸管免疫や腸内細菌叢といった免疫システムが複雑に絡み合っており、大腸において主要な IFITM である IFITM1 及び 3 がこれらに参与している可能性が示唆される。

胚組織及び PGC の分化ステージにおける IFITM の定量は今まで行われておらず、今回の実験で私はこの点を明らかにした。胚組織においては、成鳥と同様に IFITM3 が主であった。しかし、GAPDH と同レベルの発現を示した成鳥とは異なり、胚での IFITM 発現量は多くとも成鳥肺の 3%程度であった。PGC においてもその傾向は同様で、成鳥と比較して発現は低かった。また、PGC では分化に伴って IFITM3 の発現が低下し、gPGC の段階では cPGC の段階と比較して約 1/4 まで発現が低下することも明らかとなった。我々が行っている遺伝子組換えニワトリ取得法では血中循環期の cPGC に対して操作していることから、Fig. 2-9 の結果より、現行法では IFITM3 の発現が比較的高い状態の PGC にウイルスインジェクションを行っていることが示唆された。遺伝子組換えニワトリの後代を取得するためには PGC に対しての遺伝子導入が必須であるため、cPGC における発現レベルがレンチウイルスの感染に及ぼす影響を明らかにすることを試みた。

ニワトリ胚線維芽細胞由来の株化細胞 DF-1 細胞を用いて感染モデル実験を行ったが、これは PGC の取得できる数が限られているためである。DF-1 細胞は CEF 細胞由来であるため基底状態の IFITM3 の発現量は CEF 細胞に近いパターンを示した。特異的 siRNA を用いて IFITM3 をノックダウンしたところ、

mRNA レベルでの発現は gPGC レベルまで低下することは明らかにしたが、タンパク質レベルでの発現変化については特異的抗体がなかったため未解析のまま残っている。哺乳類 IFITM3 は様々な翻訳後修飾 (S-パルミトイル化、ユビキチン化、リン酸化) を受けることが知られており^[16]、ニワトリ IFITM3 の詳細な機能解明には翻訳後修飾についてさらなる解析が必要である。また、DF-1 細胞では gPGC レベルまで IFITM3 の発現が低下したことに伴って感染効率は 1.8 倍に上昇し、cPGC での IFITM3 の発現レベルは VSV-G シュードタイプレンチウイルス感染の阻害に充分であることが示唆された。阻害メカニズムの詳細については不明であるが、逆転写されたウイルス cDNA 量が減少していることに加えて哺乳類 IFITM3 の阻害メカニズムから、ウイルス膜と細胞膜との膜融合過程もしくはウイルス RNA の cDNA への逆転写ステップを阻害している可能性が示唆される。この結果は、DF-1 細胞を用いた解析系ではあるものの、PGC における IFITM3 の役割を間接的に示唆しており、PGC への遺伝子導入の難しさは PGC の増殖能の低さによるものだけではなく、内在 IFITM3 も影響を及ぼしていることが推測される。

CEF 及び鶏卵は様々なウイルスに対するワクチン生産に用いられている。今回の結果から、胚組織で IFITM の発現が低いことは効率的なワクチン生産という目的に合致すると言える。特にインフルエンザウイルスワクチンは、ウイルス液を孵卵 9 日目発育鶏卵中の漿尿腔に接種して 2 日程度培養してから漿尿液を回収することで取得しており、ウイルス増殖の足場となる漿尿膜で DF-1 細胞の約 50%程度の IFITM3 が発現していた。また、漿尿膜とは異なる糖鎖構造を持ち^[17]、実験的にヒト型インフルエンザウイルス増殖に用いられる羊膜においても、漿尿膜と同程度の発現であった。既報では、IFITM3 のノックダウンによって A 型インフルエンザウイルスの感染効率が上昇することから^[3]、鶏卵におけるインフルエンザウイルス感染は若干ではあるが基底レベルの内在 IFITM3 によって阻害されている可能性がある。さらに、鶏卵だけではなく CEF もワクチン生産に用いられており、例えば、麻疹ウイルスやおたふく風邪ウイルス、狂犬病ウイルスのワクチンがあげられる。狂犬病ウイルスのエンベロップでシュードタイプ化したレンチウイルスの感染を IFITM3 が阻害することは以前の報告^[3]で知られているため、狂犬病ウイルスのワクチン生産に関しても内在の IFITM3 が影響を及ぼしている可能性が示唆される。一方、中性の pH で細胞膜から直接侵入する麻疹ウイルスやおたふく風邪ウイルスに対して IFITM3 が阻害効果を持つかは断定できない^[18]。

これらの結果から、胚時期での IFITM3 の発現を制御することで、遺伝子組

換えニワトリの取得効率やウイルスワクチン生産効率が向上する可能性が示唆された。

なお本章の内容は下記の論文に発表した。また、図表は当該論文より引用した。

Kidani, S., Okuzaki, Y., Kaneoka, H., Asai, S., Murakami, S., Murase, Y., Iijima, S. & Nishijima, K. I. (2016). Expression of interferon-inducible transmembrane proteins in the chicken and possible role in prevention of viral infections. *Cytotechnology*, DOI: 10.1007/s10616-016-9958-1

参考文献

- [1] Bailey, C. C., Zhong, G., Huang, I. C., & Farzan, M. (2014). IFITM-family proteins: the cell's first line of antiviral defense. *Annual Review of Virology*, 1, 261-283.
- [2] Perreira, J. M., Chin, C. R., Feeley, E. M., & Brass, A. L. (2013). IFITMs restrict the replication of multiple pathogenic viruses. *Journal of Molecular Biology*, 425(24), 4937-4955.
- [3] Smith, S. E., Gibson, M. S., Wash, R. S., Ferrara, F., Wright, E., Temperton, N., Kellam, P., & Fife, M. (2013). Chicken interferon-inducible transmembrane protein 3 restricts influenza viruses and lyssaviruses in vitro. *Journal of Virology*, 87(23), 12957-12966.
- [4] Houdebine, L. M. (2000). Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Research*, 9(4-5), 305-320.
- [5] Kues, W. A., & Niemann, H. (2004). The contribution of farm animals to human health. *TRENDS in Biotechnology*, 22(6), 286-294.
- [6] Rudolph, N. S. (1999). Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends in Biotechnology*, 17(9), 367-374.
- [7] Nishijima, K. I., & Iijima, S. (2013). Transgenic chickens. *Development, Growth & Differentiation*, 55(1), 207-216.
- [8] Kamihira, M., Kawabe, Y., Shindo, T., Ono, K. I., Esaka, K., Yamashita, T., Nishijima, K. I., & Iijima, S. (2009). Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens. *Journal of Biotechnology*, 141(1), 18-25.
- [9] Kamihira, M., Ono, K. I., Esaka, K., Nishijima, K. I., Kigaku, R., Komatsu, H., Yamashita, T., Kyogoku, K., & Iijima, S. (2005). High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *Journal of Virology*, 79(17), 10864-10874.
- [10] Kodama, D., Nishimiya, D., Iwata, K. I., Yamaguchi, K., Yoshida, K., Kawabe, Y., Motono, M., Watanabe H., Yamashita, T., Nishijima, K. I., Kamihira, M., & Iijima, S. (2008). Production of human erythropoietin by chimeric chickens. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(4), 834-839.

- [11] Kyogoku, K., Yoshida, K., Watanabe, H., Yamashita, T., Kawabe, Y., Motono, M., Nishijima, K. I., Kamihira, M., & Iijima, S. (2008). Production of recombinant tumor necrosis factor receptor/Fc fusion protein by genetically manipulated chickens. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *105*(5), 454-459.
- [12] D'Costa, S., Pardue, S. L., & Petitte, J. N. (2001). Comparative development of avian primordial germ cells and production of germ line chimeras. *Avian and Poultry Biology Reviews*, *12*(4), 151-168.
- [13] Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, *88*(1), 49-92.
- [14] Motono, M., Ohashi, T., Nishijima, K. I., & Iijima, S. (2008). Analysis of chicken primordial germ cells. *Cytotechnology*, *57*(2), 199-205.
- [15] Motono, M., Yamada, Y., Hattori, Y., Nakagawa, R., Nishijima, K. I., & Iijima, S. (2010). Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *109*(4), 315-321.
- [16] Yount, J. S., Karssemeijer, R. A., & Hang, H. C. (2012). S-palmitoylation and ubiquitination differentially regulate interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3)-mediated resistance to influenza virus. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(23), 19631-19641.
- [17] Ito, T., Suzuki, Y., Takada, A., Kawamoto, A., Otsuki, K., Masuda, H., Yamada, M., Suzuki, T., Kida, H., & Kawaoka, Y. (1997). Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *Journal of Virology*, *71*(4), 3357-3362.
- [18] Smith, E. C., Popa, A., Chang, A., Masante, C., & Dutch, R. E. (2009). Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. *FEBS Journal*, *276*(24), 7217-7227.

Table 2-1

使用した培地の組成

DMEM-293	
DMEM High Glucose	13.47 g
NaHCO ₃	3.7 g
L-グルタミン	0.29 g
ピルビン酸ナトリウム	110.04 mg
HEPES	3.5 g
FBS	100 mL
100× NEAA	10 mL
ペニシリンGカリウム	89 mg
ストレプトマイシン硫酸塩	100 mg
滅菌水 up to	1 L

DMEM	
DMEM High Glucose	13.47 g
NaHCO ₃	3.7 g
FBS	100 mL
ペニシリンGカリウム	89 mg
ストレプトマイシン硫酸塩	100 mg
滅菌水 up to	1 L

Table 2-2

qRT-PCR で用いたプライマーセット

発現解析では以下のプライマーセットを使用した。IFITM2 のプライマーは、既報³⁾で用いられた配列を使用した。GAPDH は mRNA と genome DNA 解析で同じプライマーを使用した。増幅配列が異なるため区別は可能である。

sequence (5'→3')		
chicken	dir	CACACCAGCATCAACATGCC
IFITM1	rev	CCTACGAAGTCCTTGGCGAT
chicken	dir	AGGTGAGCATCCCGCTGCAC
IFITM2	rev	ACCGCCGAGCACCTTCCAGG
chicken	dir	TCACGGCCCATCTGATCAAC
IFITM3	rev	GGGTCCAATGAATTGCGGGT
chicken	dir	GACTCATCTCCCACCACTGC
IFITM5	rev	TTGACAGAGAAGGCGAGAGC
chicken	dir	GGGCACGCCATCACTATC
GAPDH	rev	GTGAAGACACCAGTGGACTCC
eGFP	dir	CGGCAACTACAAGACCCGC
	rev	GAAGTTCACCTTGATGCCGTTT

Table 2-3

クローニングに用いたプライマーセット

PGC より取得した cDNA をテンプレートとし、以下のプライマーを用いてクローニングを行った。下線部は制限酵素サイトを示しており、対応する制限酵素を使用して p3×CMV14 ベクターに挿入した。

sequence (5'→3')		
chicken IFITM1	dir	CAT <u>GAATTC</u> GCCACCATGCAGAGCTACCCTCAGCACACC
	rev	CAT <u>GGATCC</u> GGGCCGCACAGTGTACAACGGGA
chicken IFITM3	dir	CAT <u>GCGGCCGC</u> ACCATGGAGCGGGTACGCGCTTC
	rev	CAT <u>AGATCT</u> TCAGTGGGTCCAATGAATTCGGGG
chicken IFITM5	dir	CAT <u>GAATTC</u> ACCATGGATACATCCTACCCACGG
	rev	CAT <u>AGATCT</u> TCCTTGTCTCGTCATCGCTGG

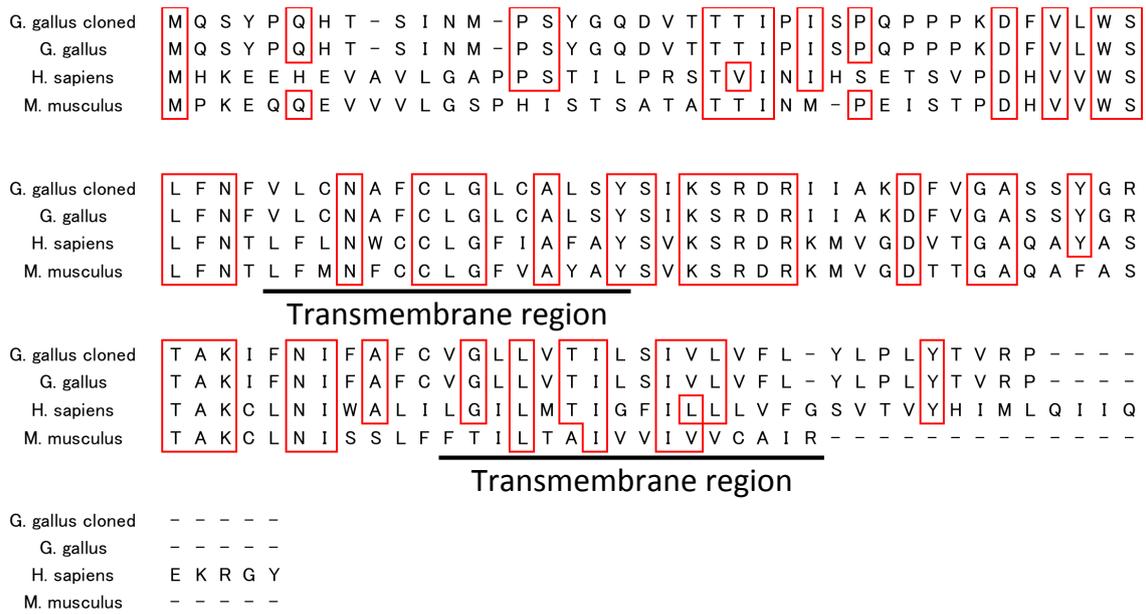


Fig. 2-1

ニワトリ IFITM1 の哺乳類オルソログとのアミノ酸アラインメント

ニワトリ IFITM1 と哺乳類 IFITM1 とのアミノ酸配列の相同性を解析した。
 G. gallus cloned; 今回クローニングしたニワトリ IFITM1、G. gallus; ニワトリ、H. sapiens; ヒト、M. musculus; マウス

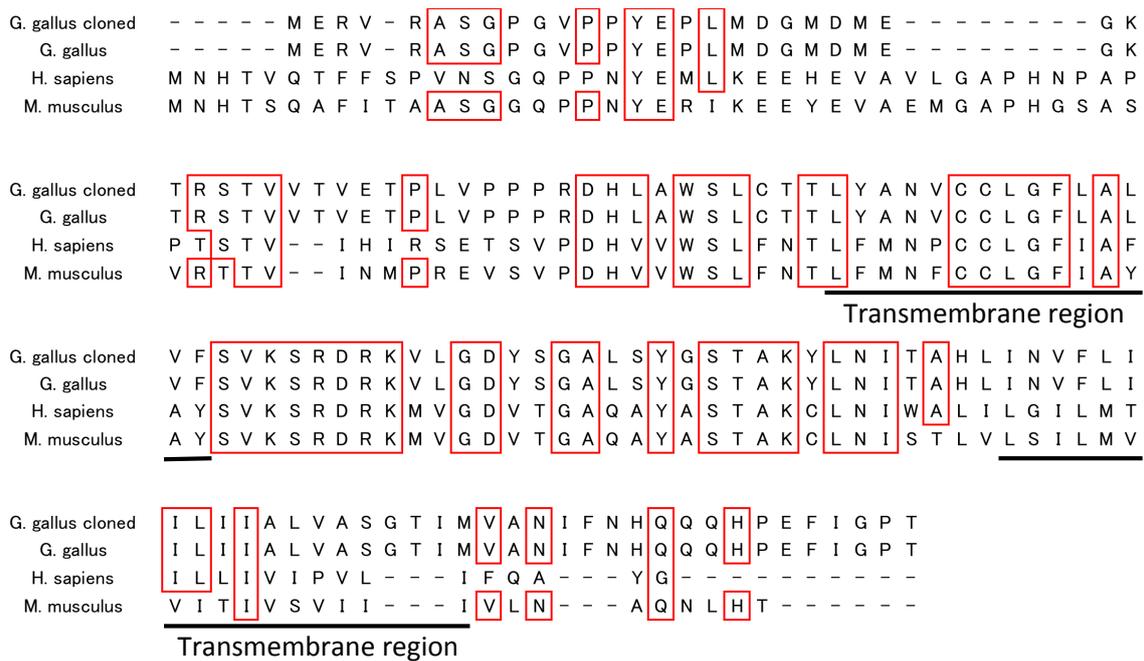


Fig. 2-2

ニワトリ IFITM3 の哺乳類オルソログとのアミノ酸アラインメント

ニワトリ IFITM3 と哺乳類 IFITM3 とのアミノ酸配列の相同性を解析した。

G. gallus cloned; 今回クローニングしたニワトリ IFITM3、G. gallus; ニワトリ、H. sapiens; ヒト、M. musculus; マウス

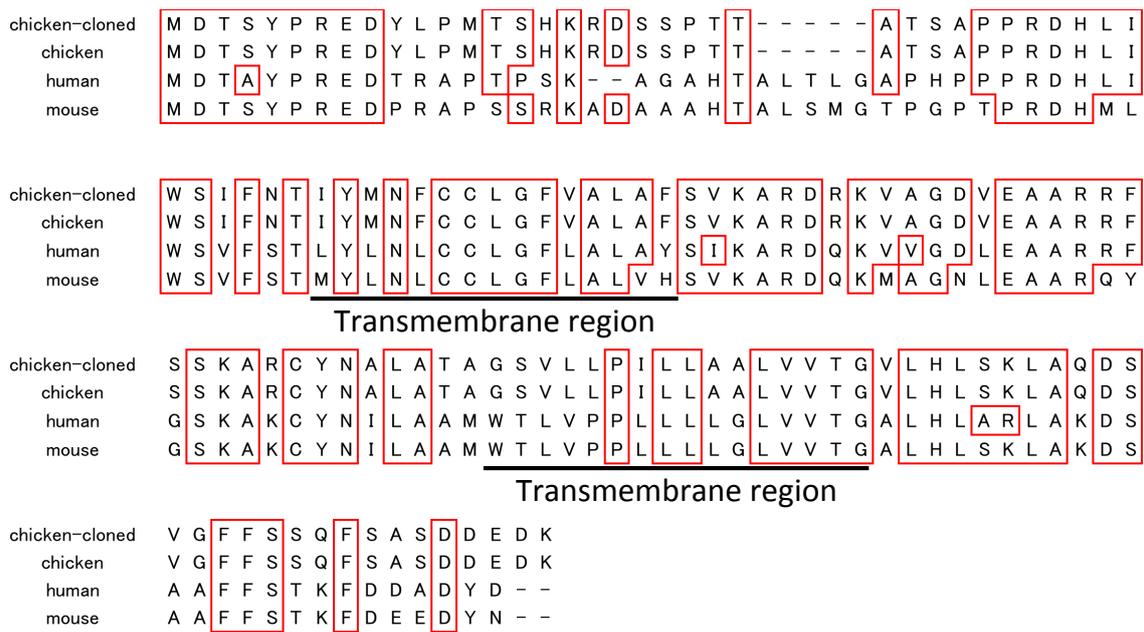


Fig. 2-3

ニワトリ IFITM5 の哺乳類オルソログとのアミノ酸アラインメント

ニワトリ IFITM5 と哺乳類 IFITM5 とのアミノ酸配列の相同性を解析した。

G. gallus cloned; 今回クローニングしたニワトリ IFITM5、G. gallus; ニワトリ、H. sapiens; ヒト、M. musculus; マウス

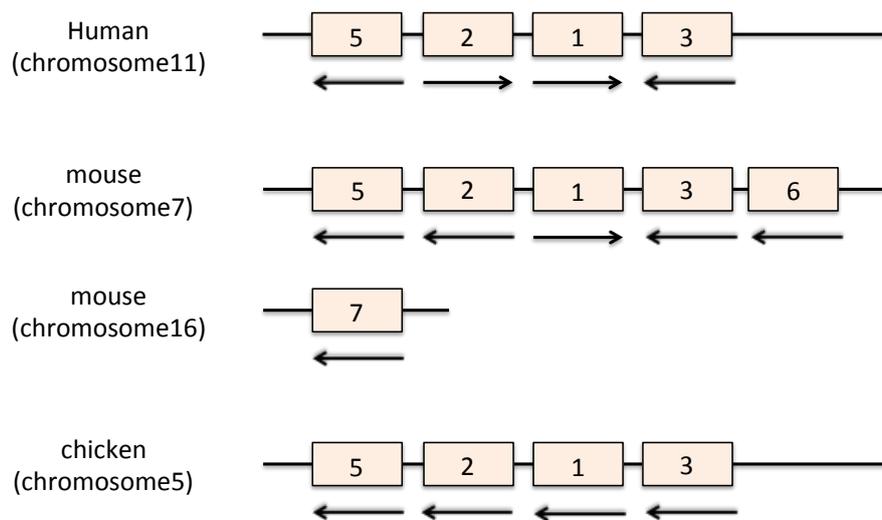
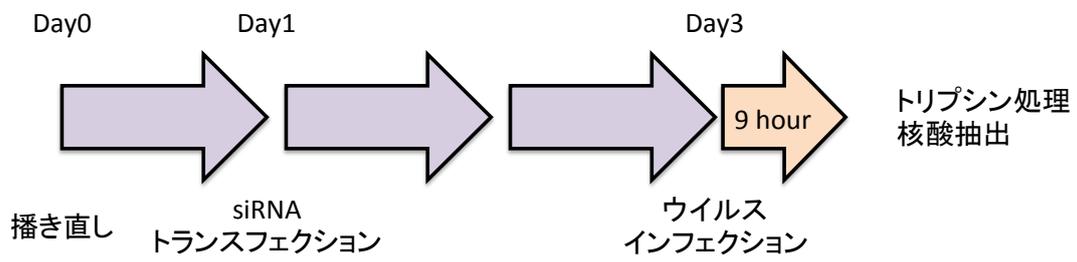


Fig. 2-4

IFITM の遺伝子クラスター構造

抗ウイルス効果が報告されている哺乳類 IFITM とニワトリ IFITM について、染色体上のクラスター構造を比較した。アミノ酸配列の相同性だけでなく (Fig. 2-1~3)、遺伝子クラスター構造も保存されており、ニワトリ IFITM についても抗ウイルス活性が期待される。

A)



B)

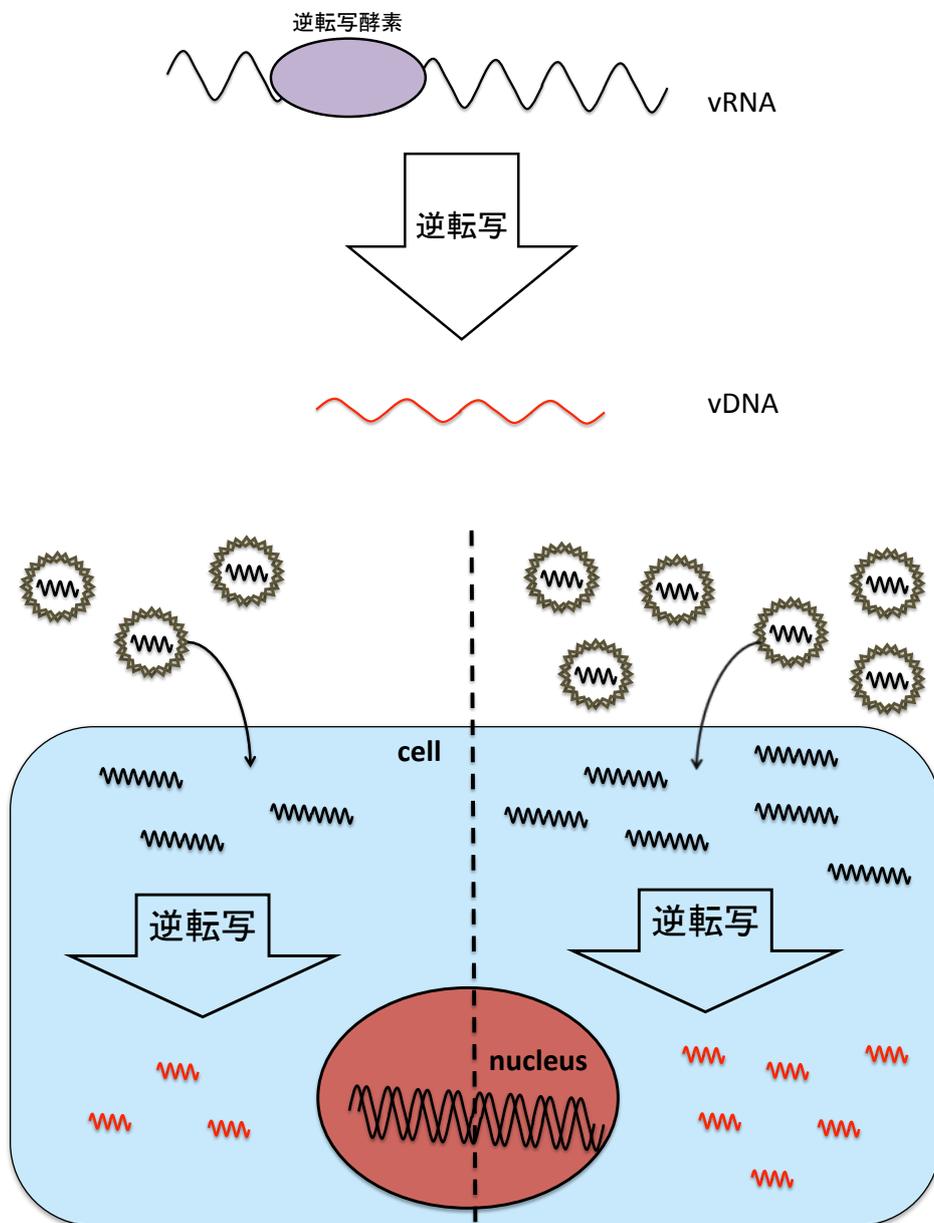


Fig.2-5

感染効率算出のモデル図

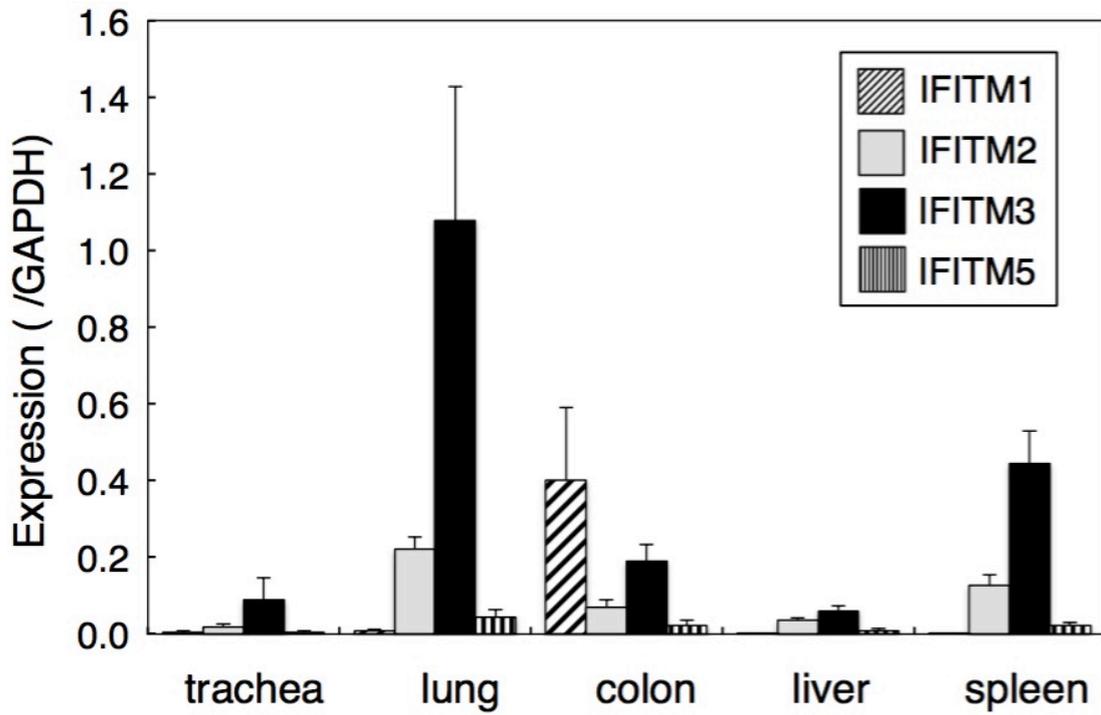
感染段階が進むとレトロウイルスのゲノム RNA (vRNA、図中黒) は酵素によって逆転写され、一本鎖 DNA (vDNA、図中赤) となる。IFITM のロックダウンにより膜融合阻害効果が失われると細胞内に取り込まれる粒子数が増えて逆転写産物量が増加すると考え、感染度の評価として vDNA 量を使用した。

A) infection の実験手順

B) 感染度算出の概念図

左図は基底状態、右図は IFITM ロックダウンによる阻害効果低下時のモデル図である。

A)



B)

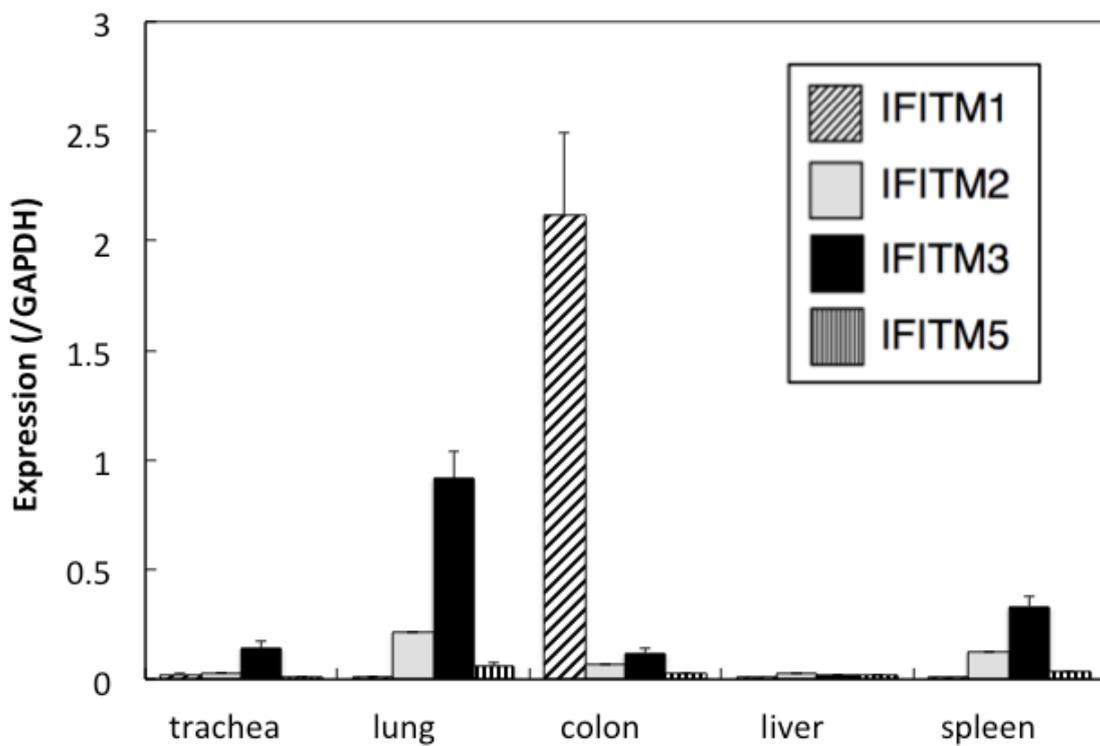


Fig. 2-6

成鳥ニワトリ組織における IFITM の発現

成鳥組織での IFITM 発現量を qRT-PCR により解析した。IFITM 発現レベルはスタンダードカーブを用いてコピー数を算出し、GAPDH コピー数に対する発現比で表現した。スタンダードカーブには制限酵素でリニアにしたプラスミドを使用し、以降の qRT-PCR でも同様に用いた。平均値及び標準誤差は、独立した 3 回の実験により得られた値から算出した。

trachea; 気道、lung; 肺、colon; 大腸、liver; 肝臓、spleen; 脾臓

A) 自家ニワトリ組織における IFITM の発現

B) SPF ニワトリ組織における IFITM の発現

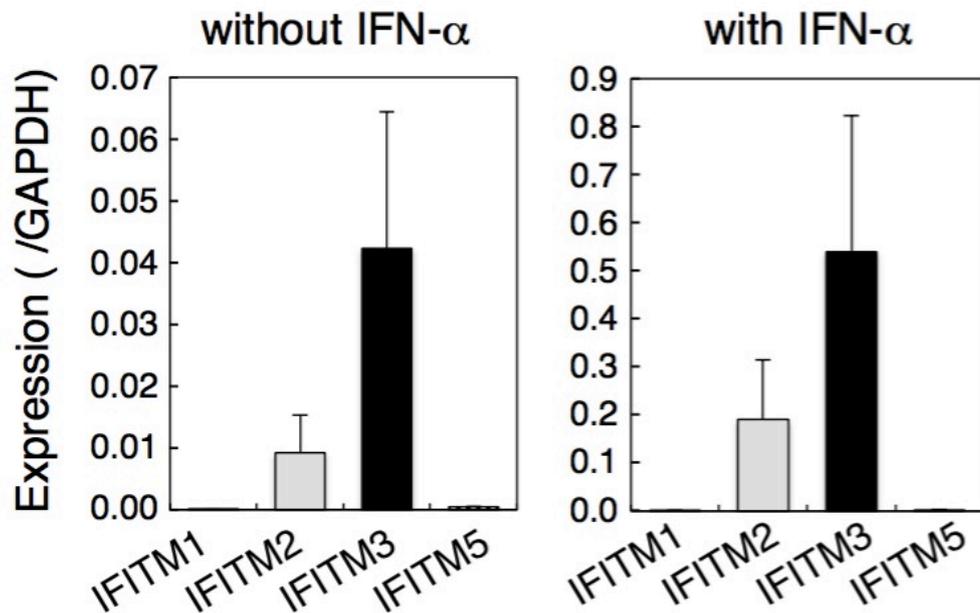


Fig. 2-7

IFN- α による IFITM の誘導

CEF を IFN- α で刺激し、IFITM の発現誘導を qRT-PCR で解析した。左図が IFN- α 無添加、右図が IFN- α 200 ng/mL で刺激したサンプルでの発現量である。コピー数を算出し、GAPDH との発現量比で評価した。平均値及び標準誤差は独立した 3 回の実験により得られた値から算出した。

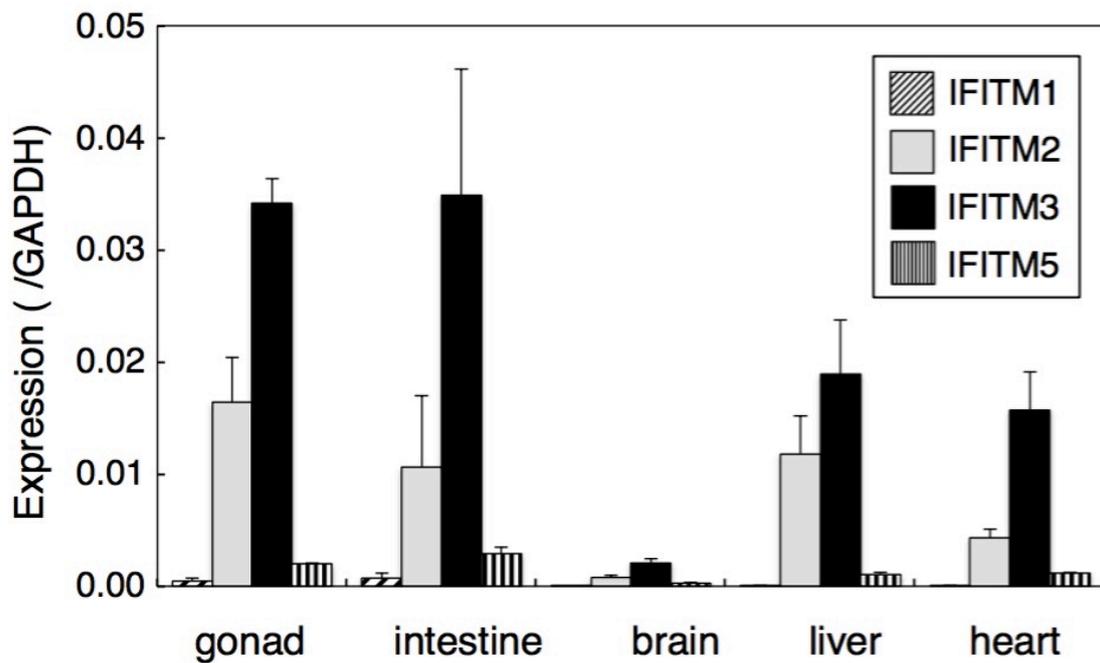


Fig. 2-8

ニワトリ胚組織における IFITM の発現

孵卵開始 5.5 日目の胚から組織を採取し、qRT-PCR により IFITM 発現レベルを解析した。なお、肺及び脾臓はこの段階ではまだ未発達であるため解析は行えなかった。平均値及び標準誤差は独立した 3 回の実験により得られた値から算出した。

gonad; 生殖腺、intestine; 腸管、brain; 脳、liver; 肝臓、heart; 心臓

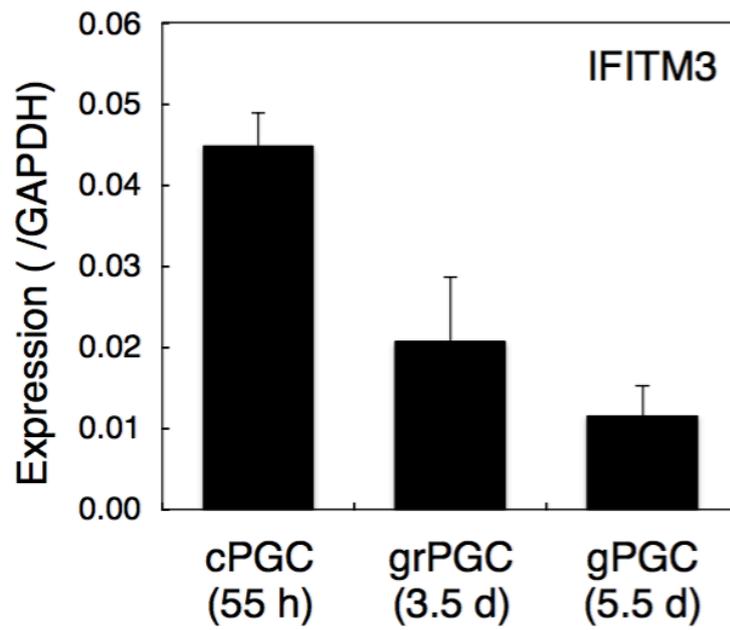


Fig. 2-9

異なる分化ステージにおける PGC での IFITM3 発現

血中 (cPGC)、生殖隆起部 (grPGC)、生殖腺 (gPGC) から PGC を採取し、qRT-PCR により IFITM3 の発現レベルを解析した。平均値及び標準誤差は 3 回の独立した実験により得られた値から算出した。

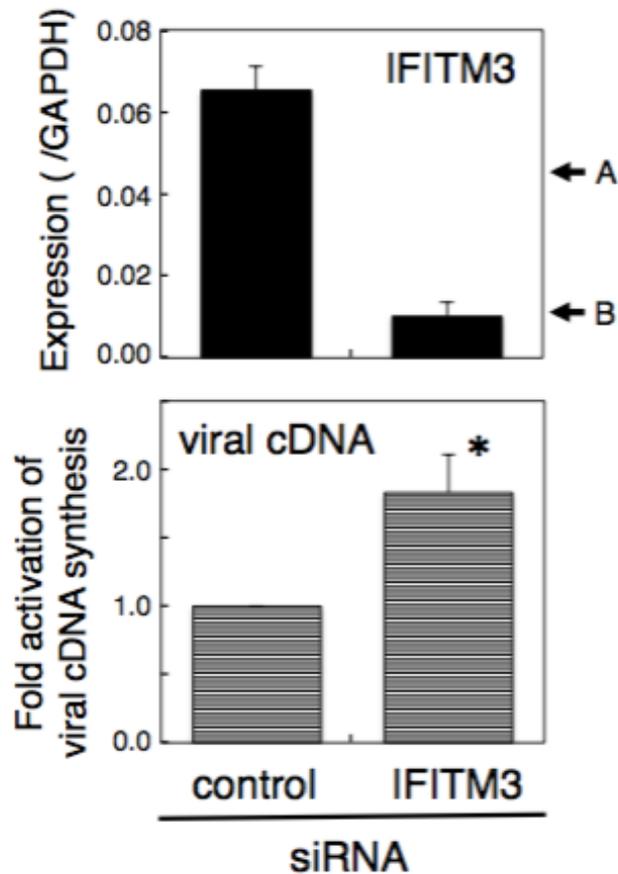


Fig. 2-10

DF-1 細胞系における IFITM3 ノックダウン感染実験

上図) 用いた siRNA によるノックダウン効率を解析した。感染実験終了時点での IFITM3 発現レベルを qRT-PCR にて解析した。

矢印 A; cPGC での IFITM3 発現レベル、B; gPGC での IFITM3 発現レベル

下図) ノックダウンに伴う感染効率の上昇を解析した。DF-1 細胞に VSV-G シュードタイプウイルスを感染させ、逆転写されたウイルス cDNA を感染効率の尺度として定量した。コントロールの siRNA を作用させた DF-1 細胞における感染効率を 1 とし、相対比で表現した。

*: t 検定 $p < 0.05$ より、有意差あり

平均値及び標準誤差は 3 回の独立した実験により得られた値から算出した。

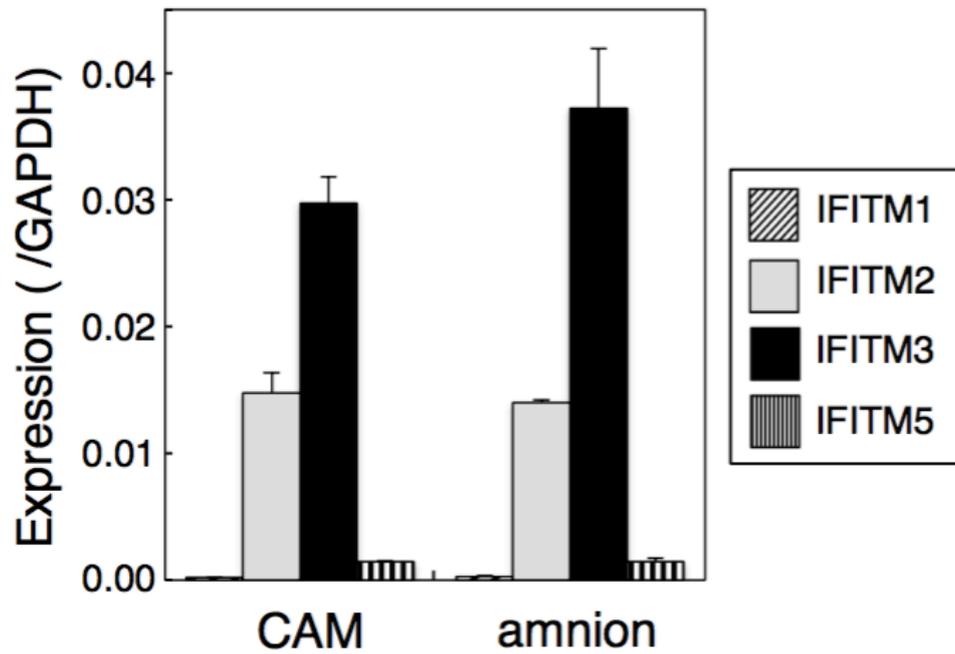


Fig. 2-11

漿尿膜及び羊膜における IFITM の発現

発育鶏卵から漿尿膜、羊膜を採取し、qRT-PCRにて発現量を定量した。平均値及び標準誤差は3個の発育鶏卵から採取した漿尿膜、羊膜より得られた値から算出した。

CAM; 漿尿膜、AMN; 羊膜

謝辞

ニワトリ組織を用いた IFITM 発現解析実験を行うにあたって、一般財団法人 日本生物科学研究所の稲吉勇仁博士より貴重な SPF ニワトリの組織試料をご提供いただきました。この場を借りて心より御礼申し上げます。

第3章

O型糖鎖生合成に関わるニワトリ シアル酸転移酵素の解析

緒言

哺乳類において、糖鎖はタンパク質の安定性だけでなく細胞間コミュニケーションや転写因子を含む細胞内分子の調節といった重要な役割を持っている^[1-3]。タンパク質の糖鎖修飾には *N*型と *O*型の2つのパターンが存在し、*N*型糖鎖修飾の重要性は既に知られている通りである^[4]。*O*型糖鎖修飾はセリン (Ser) もしくはスレオニン (Thr) 残基で起こる。最もよく知られているタイプはムチン型の糖鎖で、Ser/Thr 残基に開始糖として *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が結合している。他のタイプの *O*型糖鎖修飾も報告されており、開始糖として *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、キシロース、ガラクトース (Gal)、フコース、マンノースが知られている^[5]。この中で、ムチン型の *O*型糖鎖はタンパク質の安定性、血中濃度、機能に重要な影響を与えていることが知られており、例えば組換え抗体 IgA2 は IgA1 より早く血中から除かれることが報告されている^[6]。この2つのサブクラス間の違いはヒンジ領域にある13アミノ酸で、IgA1 ではこの領域に3~5個の *O*型糖鎖修飾がおこるのに対して IgA2 では糖鎖修飾がおこらない。また BR3-Fc の場合多くの *O*型糖鎖修飾点を持っており、シアル酸の結合度合いがタンパク質分解に影響を及ぼす。これらアシアロ糖タンパク質が素早く分解される理由として、肝臓のレクチンによってアシアロ Gal もしくはアシアロ GalNAc がトラップされてしまうことが挙げられる^[7]。

多くのバイオ医薬品は糖タンパク質である。糖鎖に依存した生物活性を示すため、糖鎖修飾を制御して最適化する技術は非常に重要で、*N*型糖鎖修飾の制御は高等生物、例えば植物や昆虫、CHO では成功している^[8]。当研究室では、ニワトリに糖鎖付加したタンパク質を生産させるべく研究を行っており、これまでに有用タンパク質を生産する遺伝子組換えニワトリの取得には成功した^[9-12]。しかし、解析を進めた結果、卵白中に生産させたタンパク質には *N*型糖鎖修飾の末端に位置するシアル酸 (Sia) と Gal が付加していないことが明らかとなった^[13,14] ため、Gal 転移酵素を遺伝子導入して末端に Gal 転移が行えるニワトリを取得し、ニワトリ *N*型糖鎖合成に関与する ST についても機能解析を行った^[15,16]。一方で、*O*型糖鎖修飾は制御が複雑かつあまりよくわかっていないため^[17]、ニワトリにおいてあまり研究が進んでいなかった。

そこで、ニワトリにおける *O*型糖鎖修飾の制御機構の中でも特に末端の Sia 転移について明らかにするため、本章ではニワトリのシアル酸転移酵素 ST (SialylTransferase) をクローニングし、機能を解析した。*O*型糖鎖修飾に関与

する 3 つのニワトリ ST を 293FT 細胞で発現させ、種々の基質に対して反応させて基質特異性を明らかにした。加えて、以前解析した ST^[18] についても範囲を広げてさらなる基質特異性を明らかにした。さらに、qRT-PCR によりニワトリ組織及び胚組織での ST の発現を定量的に解析した。

実験材料及び手法

試薬

ガラクトース- β 1,4-N-アセチルグルコサミン (Gal- β 1,4-GlcNAc)、GM1a、アシアロフェツインは Sigma-Aldrich から購入した。ガラクトース- β 1,3-N-アセチルグルコサミン (Gal- β 1,3-GlcNAc) は、Dextra Laboratories Ltd. (Reading, UK) より購入した。ガラクトース- β 1,3-N-アセチルガラクトサミン (Gal- β 1,3-GalNAc) は、Tronto Research Chemicals (Ontario, Canada) から購入した。ラクトシルセラミドは長良サイエンス (岐阜, 日本)より購入した。これらの基質を利用し、ニワトリ ST の活性測定を行った。

ニワトリ ST のクローニング

ニワトリの β -ガラクトシド- α 2,3-シアル酸転移酵素 (ST3Gal; β -galactoside α 2,3-sialyltransferase) は、ニワトリブラストダームもしくは成鳥脳の cDNA から PCR により増幅し、pcDNA4/TO/myc-HisA (Invitrogen) ベクターにクローニングした。増幅に用いたプライマーは Table3-1A に示した。これらのプライマーは、Table3-1B に示したシーケンスデータから作製した。また、NIH3T3 細胞から取得した cDNA を用いて PCR を行い、マウス ST3Gal5 もポジティブコントロールとしてクローニングした。プライマー及びシーケンスデータは Table 3-1 で示した。

ST 活性測定

293FT 細胞は、10% FBS 及び抗生物質を含む DMEM-293 培地で培養した。トランスフェクション前日に、35mm dish へ 5×10^5 (cells/dish) で播き直し、その翌日に 2.5 μ g のニワトリ ST 発現ベクター (pcDNA4/TO/myc-HisA+ckSTs) を Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。48 時間培養し、PBS で洗浄してからサスペンションバッファー (1% TritonX-100 を含む PBS) で懸濁したのちに Bioruptor (コスモ・バイオ, 東京, 日本) で sonication を行い、10000 rpm、4 °C で 5 分遠心して細胞残渣を取り除いた。活性の測定は Fig. 3-1 に示した流れで行った。炭素の放射性同位体である 14 C でラベルした CMP-Sia は、American Radiolabeled Chemicals

(St.Louis, MO, USA) より購入した。全体の反応液量は 20 μ L とし、図中の組成で 37°C で一晩反応させた。翌日、反応液 5 μ L を、HPTLC シリカゲル 60 プレート

(10 cm \times 10 cm、 Merck Millipore, Darmstadt, Germany) にスポットして展開した。展開液は、使用した基質によって以下の 2 種類を使い分けた。

合成糖; 1-ブタノール : エタノール : H₂O = 5 : 3 : 2

糖脂質; クロロホルム : メタノール : 0.25 %KCl 水溶液 = 60 : 35 : 8

展開したプレートは -80 °C で X 線フィルム (FUJIFILM, 東京, 日本) に 2 日もしくはイメージングプレート (FUJIFILM) に 1 日露光した。

糖タンパク質に対する反応性の解析では、25 μ g のアシアロフェツインを用いて反応させた。反応条件は合成糖を基質とした時と同様である。一晩反応させたのち、反応液を SDS-PAGE にて展開泳動し、モデル 583 ゲルドライヤー (BioRad, Hercules, CA, USA) を用いてゲルを乾燥させてからイメージングプレートに露光した。

露光したイメージングプレートはイメージアナライザー Typhoon FLA9000 (GE ヘルスケアジャパン, 東京, 日本) により解析した。また、ニワトリ ST の発現レベルはウェスタンブロットにより定量した。1 次抗体は抗 His 抗体 (医学生物学研究所, 名古屋, 日本)、2 次抗体にはヤギ抗マウス IgG-HRP 抗体 (Santa Cruz) を使用した。

定量リアルタイム PCR (qRT-PCR)

RNA は、当研究室で飼育した成鳥ニワトリの組織から、ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いて抽出した。解析に用いた組織は、脳 (brain)、肺 (lung)、肝臓 (liver)、腎臓 (kidney)、卵管膨大部 (magnum)、小腸 (small intestine)、大腸 (large intestine)、脾臓 (spleen) である。また、孵卵 9 日目の胚より漿尿膜及び羊膜を取得した。さらに、以前論文にて報告した手法で^[19]、輸卵管上皮細胞 TGC (Tubular Gland Cell) を取得した。取得した RNA は、ReverTra Ace (東洋紡) で逆転写し、得られた cDNA を 5 倍希釈してから THUNDREBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いて qRT-PCR を行った。機器は LightCycler96 (Roche) を使用し、PCR サイクル条件は以下の通りである。

95 °C	1 min	
95 °C	3 sec	← 40cycles
60 °C	10 sec	
72 °C	30 sec	

使用したリアルタイム PCR プライマーは Table 3-2 で示した。なお、ST3Gal3, 4, 6 及び ST6Gal1, 2 のプライマーは、以前の論文で使用したものを^[18]。スタンダードカーブはクローニングしたプラスミドを制限酵素でリニア化したものを^[18]。

実験結果

ニワトリ ST3Gal のクローニングと基質特異性

哺乳類では 20 種のシアル酸転移酵素 ST が知られている^[17,20-22]。しかし、ニワトリでは解析が進んでいなかったため、以前当研究室ではニワトリにおいて *N* 型糖鎖修飾に關与する ST3Gal3, 4, 6 及び ST6Gal1, 2 について解析した^[18]。そこで、本章ではまず、解析していなかった *O* 型糖鎖修飾關連 ST である ST3Gal1, 2, 5 について哺乳類 ST との相同性を基に解析した。また、以前の報告では ST3Gal4 及び ST6Gal2 については合成糖基質 Gal-β1,4-GlcNAc に対して活性を検出することができなかつたため、以前解析した *N* 型糖鎖合成に關与する ST3Gal3, 4, 6 についても広範に特異性を解析した。

まずはニワトリとヒトでのアミノ酸残基の相同性を解析した (Fig. 3-2~4)。ST3Gal1 で 67%、ST3Gal2 で 85%、ST3Gal5 で 64% のアミノ酸相同性であった。ST3Gal5 はヒトとマウスで幾つかの翻訳開始点の違いと種々のスプライシングバリエントが報告されており、酵素の細胞質領域の長さが異なることが知られている^[23]。ニワトリの ST3Gal5 はその相同性から、細胞質領域の短いヒト ST3Gal5 バリエントである M-SAT-1/ST3Gal5 に近いと示唆される。これらの ST について他の生物由来の ST とアミノ酸の相同配列を解析したところ、哺乳類 ST と同様に *N* 末端の膜貫通ドメインとステム領域及び酵素活性中心 (L, S, III, VS モチーフ) が保存されていることが明らかとなった。

ST3Gal1 はクローニングの過程で想定よりも短い配列が取得できたため、DNA 配列についてシーケンス解析により確認した。短い配列は 10 個のクローンをピックアップした中の 1 つで、exon4 全体にあたる 171~230 番の 60 アミノ酸が欠失しており、最初の 19 アミノ酸は L ドメインの C 末端側 19 残基であることが明らかとなった。また、ヒトでは ST3Gal1 にシュード遺伝子が存在する^[21]ため、取得した短いニワトリ ST3Gal1 がシュード遺伝子か検討した。シュード遺伝子は ST3Gal1 の *N* 端領域を持ち L ドメイン中にストップコドンが存在するという特徴があるが、このクローンは L ドメイン中にストップコドンが存在しない。ここから、この短いクローンは ST3Gal1 のスプライシングバリエントであることが示唆される。

次に、His タグ結合のニワトリ ST3Gal を発現させた 293FT 細胞の lysate を用いて活性の測定を行った (Fig. 3-5)。ST の発現レベルは抗 His 抗体を用いたウェスタンブロットにより検出し、発現レベルは異なるがそれぞれの ST

で発現が見られることを示した (Fig. 3-5A)。ST 活性はラジオアイソトープを用いた系で行い、¹⁴C でラベルした CMP-Sia をドナーとして、糖基質 (アクセプター) に対する基質特異性を解析した。Fig. 3-5B に示すように O 型糖鎖の基質である Gal-β1,3-GalNAc をアクセプターとして用いた場合、ST3Gal1, 2 は活性を示したものの ST3Gal5 は活性を示さなかった。さらに、取得した ST3Gal1 スプライシングバリエントでも反応を行ったが、活性は示さず (Fig. 3-5C)、L ドメインの C 末端側が一部欠損しているため活性を示すことができないことが示された。O 型糖鎖修飾に関する ST だけではなく以前解析した N 型糖鎖修飾に関与する ST (ST3Gal3, 4, 6) についても解析したが、Gal-β1,3-GalNAc に対しては活性を示さなかった (Fig. 3-5B)。次に N 型糖鎖に対する反応性を解析したところ、存在量が少ない N 型糖鎖構造である Gal-β1,3-GlcNAc に対しては ST3Gal1, 2 が活性を示し、以前解析を行った ST3Gal3 も活性を示したが、ST3Gal5 は活性を示さなかった (Fig. 3-5D)。また、主要な N 型糖鎖構造である Gal-β1,4-GlcNAc に対しては以前同様 ST3Gal6 が強い活性を示し、ST3Gal3 は弱い活性を示す結果が得られた^[18]が、ST3Gal1, 2, 5 は活性を示さなかった (Fig. 3-5E)。

これらから、ST3Gal3 は主要な N 型基質である Gal-β1,4-GlcNAc に加えてまれな N 型基質である Gal-β1,3-GlcNAc に対しても活性を示すことが明らかとなった。哺乳類においては、ST3Gal3 は基質特異性が Gal-β1,3-GlcNAc > Gal-β1,4-GlcNAc であることが知られており、ニワトリ ST3Gal3 も哺乳類 ST3Gal3 と同様の基質特異性を持つことが新たに示された。また、ST3Gal1, 2 は O 型糖鎖修飾だけではなく、部分的に N 型糖鎖修飾にも関与することが示唆された。

糖脂質及び糖タンパク質に対する ST 活性

さらに広範に基質特異性を明らかにするために、糖基質だけではなく糖脂質に対する ST 活性についても解析した。基質としてガングリオシドの合成経路に関与する脂質である GM1a 及びラクトシルセラミドを使用した。これらを受容体とするシアル酸転移反応では脳に多く存在するガングリオシドである GD1a^[24]及び GM3 が合成される。ST3Gal2 は GM1a に対して強い ST 活性を示し、ST3Gal1 も弱い活性を示したが、ST3Gal3, 4, 5, 6 は GM1a に対しては活性を示さなかった (Fig. 3-6A)。一方、ラクトシルセラミドに対する活性を解析したところ、ポジティブコントロールであるマウス ST3Gal5^[25]に加えて

ニワトリ ST3Gal5 も活性を示し GM3 のバンドを得た (Fig. 3-6B)。この結果から、ニワトリ ST3Gal5 は GM3 の合成酵素である可能性が示唆された。

今までアクセプターとして用いた基質は、合成糖基質である。生理条件下に近い基質で ST 活性を明らかにするために、3 本ずつの N 型糖鎖及び O 型糖鎖構造を持つ糖タンパク質であるフェツイン^[26] からシアル酸を除いたアシアロフェツインを用いて解析を行った (Fig. 3-7)。結果、ST3Gal1, 2 が強い活性を示し、ST3Gal3, 6 が弱い活性を示したことから、ニワトリにおいても ST3Gal1, 2, 3, 6 がタンパク質の糖鎖修飾に関与していることが示された。ST3Gal3, 6 で活性が低かった理由としては基質に対する特異性が低かったためであると推測される。また、ST3Gal5 はタンパク質基質に対して反応性を示さなかった。

組織におけるニワトリ ST の発現分布

さらに、ニワトリ組織における ST3Gal の発現を qRT-PCR により解析した (Fig. 3-8A)。以前報告した N 型糖鎖修飾に関与する ST の発現パターンとは異なり、肝臓における ST3Gal1, 2, 5 の発現は著しく低かった。ST3Gal1 は気道、肺、卵管膨大部、脾臓で高く、ST3Gal5 は卵管膨大部、小腸、大腸、脾臓で強く発現していた。

また、卵白成分を生産する組織である卵管膨大部の輸卵管上皮細胞 TGC についても、ST の発現を解析した (Fig. 3-8B)。ST3Gal1, 5 が TGC で強く発現しており、ST3Gal1 が卵白タンパク質の O 型糖鎖修飾に関与していることが示唆される。また、次いで ST3Gal6 の発現が高く、糖タンパク質中の Gal-β1,4-GlcNAc へのシアル酸転移能力が示唆される。

前章でも述べた通り、インフルエンザウイルスのワクチンは発育鶏卵中で作製されるが、ニワトリインフルエンザウイルスは α2,3 結合のシアル酸を認識するのに対してヒトインフルエンザウイルスは α2,6 結合のシアル酸を認識して感染することが知られている。効率的なヒトインフルエンザワクチン取得のためには鶏卵中のシアル酸プロファイルを解析する必要があると考え、シアル酸転移酵素である ST について漿尿膜及び羊膜での発現を解析した (Fig. 3-9)。α2,3 結合のシアル酸転移に関与する ST3Gal1, 5, 6 は漿尿膜及び羊膜で高い発現レベルを示したが α2,6 結合のシアル酸転移に関与する ST6Gal1, 2 の発現は低かったことから、漿尿膜及び羊膜におけるタンパク質及びガングリオシドの糖鎖修飾パターンは α2,3 結合のシアル酸が主であることが示唆された。

考察

哺乳類では 20 種類の ST が知られており、

1. ST3Gal ファミリー
2. ST6Gal ファミリー
3. ST6GalNAc ファミリー
4. ST8Sia ファミリー

の 4 種類に大別できる^[17,21]。これら 4 種類のうち、ST6Gal ファミリー (ST6Gal1, 2) 及び ST3Gal ファミリーの一部 (ST3Gal3, 4, 6) については以前当研究室でクローニングがなされ、解析が行われた。ST3Gal4 及び ST6Gal2 については活性を検出することができなかったものの、ST3Gal3, 6 及び ST6Gal1 は主要な N 型糖鎖構造である Gal-β1,4-GlcNAc 及び糖タンパク質アシアロフェツインに対して活性を示し、ニワトリ ST が哺乳類 ST と同様の酵素活性を持つことを明らかにした^[18]。

そこで本章で、ニワトリ ST3Gal における残り 3 つの酵素 (ST3Gal1, 2, 5) の基質特異性を解析した結果、ST3Gal1, 2 の基質特異性は Gal-β1,3-GlcNAc 及び Gal-β1,3-GalNAc、糖脂質では Gal-β1,3-GalNAc であった。ST3Gal1 については既に基質特異性は報告されているが^[27]、我々の結果はそれに反するものではなかった。加えて、ヒトでは ST3Gal3, 4, 5 についてスプライシングバリエントが報告されており^[23,28]、今回我々はニワトリ ST3Gal1 でもスプライシングバリエントが存在することを示した。スプライシングバリエントの多くは糖転移活性を失っていることが知られているが、ST3Gal1 も同様に活性を失っていた。ニワトリ ST3Gal6 にも不活性バリエントが存在することは以前に報告^[18]しており、哺乳類と同様に他の ST3Gal ファミリーにもバリエントが存在することが示唆されるが、これら ST3Gal ファミリーに多くのバリエントが存在する理由は不明である。また、ニワトリ ST3Gal5 は哺乳類のオルソログ同様ラクトシルセラミド Gal-β1,3-Glc-Ceramide に対してのみ基質特異性を示し、GM3 合成酵素であることを示唆する結果を得た。これらの結果から、O 型糖鎖修飾に関与するニワトリ ST は哺乳類 ST と機能的に相同であることが示された。

哺乳類においては、ST3Gal ファミリーはさらに 2 つのサブファミリーに分別される。1 つは ST3Gal1, 2 のグループ、もう 1 つは ST3Gal3, 4, 5, 6 のグループで、前者は O 型糖鎖修飾に関与することが知られている。以前の解析では、卵管膨大部より取得したゴルジ画分が O 型糖鎖の基質である Gal-β1,3-GalNAc

に対して強い活性を示したことから、卵管膨大部及びTGCでのST3Galの発現を解析した。qRT-PCRの結果から、卵管膨大部ではST3Gal1が強く発現しており、以前観察^[18]された強いST活性はO型糖鎖構造に対するST3Gal1の活性であることが示唆された。

O型糖鎖の中でも、ムチン型はcore1~4までさらに4種類のコア構造に分類される^[29]が、タンパク質に対するO型糖鎖修飾の大部分はcore1構造である。例えばCHO細胞に生産させたエリスロポエチンはcore1を持つことが知られている^[30]。また、ヒトIFNがcore1の糖鎖修飾を受けることが報告されており、30%がモノシアル酸、50%がジシアル酸であると言われているが、ヒトIFNを遺伝子組換えニワトリで生産させると29%がモノシアル酸、9%がジシアル酸、20%が非シアル酸となることが知られている^[31]。本章の結果も加味すると、ニワトリではST3Gal1, 2がO型糖鎖修飾に関与し、core1タイプの糖鎖合成に関与している可能性が示された。しかし、ジシアル酸の割合が通常のIFNと比べて低いため、core1のO型糖鎖修飾機構を完全に明らかにするためには根元のGalNAcにシアル酸を転移させるST6GalNAcファミリーの基質特異性と卵管膨大部での機能を明らかにすることが必要である。これまでの結果を総合すると、卵白タンパク質は確かにO型糖鎖修飾を受けている一方、N型糖鎖修飾は不十分で末端にGal及びSiaが存在しないことが示されている^[13-16]。

粘膜は、気管におけるガス交換や腸における栄養分の吸収など様々な機能を担っているが、ウイルスの感染時にも重要な役割を果たしている^[32-33]。表面を構成しているのがムチンで、複数のO型糖鎖修飾にST3Gal1が関与する。組織でのqRT-PCRの結果から、気道及び肺でST3Gal1が高発現していることは妥当であると言える。一方で、今回の解析では小腸及び大腸でST3Gal5の発現が高く、脳で低いという特徴が見られた。実際、消化管には一定量のガングリオシドが存在することは言われているものの、マウスにおけるST3Gal5の発現パターンと今回のニワトリ組織での発現パターンとは異なっている。また、哺乳類においてST3Gal5はガングリオシドに富む脳で特異的に高い発現を示すことが知られており^[25]、ニワトリの脳でST3Gal5が低い理由については不明である。

前章でも述べたが、鶏卵はインフルエンザウイルスのワクチン生産に用いられている。インフルエンザウイルスは膜表面のシアル酸を認識して感染が進行するため、ウイルスの感染が起こる漿尿膜及び羊膜において α 2,3結合シアル酸合成に関与するST3Galファミリーと α 2,6結合シアル酸合成に関与するST6Galの発現を解析した。その結果、これらの組織ではST3Galは高く

ST6Gal は低いという結果が示され、鶏卵中では $\alpha 2,3$ 結合のシアル酸が主であることが示唆された。レクチンブロットを用いた今までの知見では、漿尿膜で主に $\alpha 2,3$ 結合のシアル酸が存在する一方、羊膜では $\alpha 2,3$ 及び $\alpha 2,6$ 結合のシアル酸が混在することが知られている¹³⁴⁾。今回我々が得た結果は既報には矛盾しないものの、ST6Gal の発現が低いにもかかわらず $\alpha 2,6$ 結合のシアル酸が存在するという疑問は残る。考えられる可能性としては、O型糖鎖の根元にある GalNAc の存在がある。GalNAc に $\alpha 2,6$ 結合でシアル酸を転移する酵素として ST6GalNAc ファミリーが知られており、この酵素によって結合した分枝シアル酸がレクチンと反応している可能性は排除できない。鶏卵における糖鎖修飾を解明するためには、ST6GalNAc についてさらなる解析が必要であると考えらる。

なお本章の内容は下記の論文に発表した。また、図表は当該論文より引用した。

Kidani, S., Kaneoka, H., Okuzaki, Y., Asai, S., Kojima, Y., Nishijima, K. I., & Iijima, S. (2016). Analyses of chicken sialyltransferases related to O-glycosylation. *Journal of bioscience and bioengineering in press*. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.03.017

参考文献

- [1] Pilatte, Y., Bignon, J., & Lambré, C. R. (1993). Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology*, *3*(3), 201-218.
- [2] Brooks, S. A. (2004). Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use. *Molecular Biotechnology*, *28*(3), 241-255.
- [3] Nagel, A. K., & Ball, L. E. (2015). Chapter Four-Intracellular Protein O-GlcNAc Modification Integrates Nutrient Status with Transcriptional and Metabolic Regulation. *Advances in Cancer Research*, *126*, 137-166.
- [4] Fukuda, M. N., Sasaki, H., Lopez, L., & Fukuda, M. (1989). Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates. *Blood*, *73*(1), 84-89.
- [5] Steen, P. V. D., Rudd, P. M., Dwek, R. A., & Opdenakker, G. (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *33*(3), 151-208.
- [6] Rifai, A., Fadden, K., Morrison, S. L., & Chintalacharuvu, K. R. (2000). The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig) A1 and IgA2 isotypes. *The Journal of Experimental Medicine*, *191*(12), 2171-2181.
- [7] Stefanich, E. G., Ren, S., Danilenko, D. M., Lim, A., Song, A., Iyer, S., & Fielder, P. J. (2008). Evidence for an asialoglycoprotein receptor on nonparenchymal cells for O-linked glycoproteins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *327*(2), 308-315.
- [8] Sethuraman, N., & Stadheim, T. A. (2006). Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, *17*(4), 341-346.
- [9] Kamihira, M., Ono, K. I., Esaka, K., Nishijima, K. I., Kigaku, R., Komatsu, H., Yamashita, T., Kyogoku, K., & Iijima, S. (2005). High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *Journal of Virology*, *79*(17), 10864-10874.
- [10] Kyogoku, K., Yoshida, K., Watanabe, H., Yamashita, T., Kawabe, Y., Motono, M., Nishijima, K. I., Kamihira, M., & Iijima, S. (2008). Production of recombinant tumor necrosis factor receptor/Fc fusion protein by

genetically manipulated chickens. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(5), 454-459.

[11] Motono, M., Yamada, Y., Hattori, Y., Nakagawa, R., Nishijima, K. I., & Iijima, S. (2010). Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(4), 315-321.

[12] Kodama, D., Nishimiya, D., Nishijima, K. I., Okino, Y., Inayoshi, Y., Kojima, Y., Ono, K. I., Motono, M., Miyake, K., Kawabe, Y., Kyogoku, K., Yamashita, T., Kamihira, M., & Iijima, S. (2012). Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(2), 146-153.

[13] Kodama, D., Nishimiya, D., Iwata, K. I., Yamaguchi, K., Yoshida, K., Kawabe, Y., Motono, M., Watanabe, H., Yamashita, T., Nishijima, K. I., Kamihira, M., & Iijima, S. (2008). Production of human erythropoietin by chimeric chickens. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(4), 834-839.

[14] Kamihira, M., Kawabe, Y., Shindo, T., Ono, K. I., Esaka, K., Yamashita, T., Nishijima, K. I., & Iijima, S. (2009). Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens. *Journal of Biotechnology*, 141(1), 18-25.

[15] Mizutani, A., Tsunashima, H., Nishijima, K. I., Sasamoto, T., Yamada, Y., Kojima, Y., Motono, M., Kojima, J., Inayoshi, Y., Miyake, K., Park, E. Y., & Iijima, S. (2012). Genetic modification of a chicken expression system for the galactosylation of therapeutic proteins produced in egg white. *Transgenic Research*, 21(1), 63-75.

[16] Kojima, Y., Wakita, J., Inayoshi, Y., Suzuki, R., Yamada, Y., Kaneoka, H., Nishijima, K. I., & Iijima, S. (2014). Galactosylation of human erythropoietin produced by chimeric chickens expressing galactosyltransferase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(6), 676-679.

[17] Takashima, S., & Tsuji, S. (2011). Functional diversity of mammalian sialyltransferases. *Trends in Glycoscience and Glycobiology*, 23(132), 178-193.

- [18] Kojima, Y., Mizutani, A., Okuzaki, Y., Nishijima, K. I., Kaneoka, H., Sasamoto, T., Miyake, K., & Iijima, S. (2015). Analyses of chicken sialyltransferases related to N-glycosylation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *119*(6), 623-628.
- [19] Morshed, M., Sano, S., Nishimiya, D., Ando, M., Nishijima, K. I., & Iijima, S. (2006). Chicken ovalbumin promoter is demethylated upon expression in the regions specifically involved in estrogen-responsiveness. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *70*(6), 1438-1446.
- [20] Audry, M., Jeanneau, C., Imberty, A., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., & Breton, C. (2011). Current trends in the structure–activity relationships of sialyltransferases. *Glycobiology*, *21*(6), 716-726.
- [21] Takashima, S. (2008). Characterization of mouse sialyltransferase genes: their evolution and diversity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *72*(5), 1155-1167.
- [22] Harduin-Lepers, A., Mollicone, R., Delannoy, P., & Oriol, R. (2005). The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology*, *15*(8), 805-817.
- [23] Uemura, S., Yoshida, S., Shishido, F., & Inokuchi, J. I. (2009). The cytoplasmic tail of GM3 synthase defines its subcellular localization, stability, and in vivo activity. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(13), 3088-3100.
- [24] Sonnino, S., Bassi, R., Chigorno, V., & Tettamanti, G. (1990). Further studies on the changes of chicken brain gangliosides during prenatal and postnatal life. *Journal of Neurochemistry*, *54*(5), 1653-1660.
- [25] Kono, M., Takashima, S., Liu, H., Inoue, M., Kojima, N., Young-Choon, L., Hamamoto, T., & Tsuji, S. (1998). Molecular cloning and functional expression of a fifth-type α 2, 3-sialyltransferase (mST3Gal V: GM3 synthase). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *253*(1), 170-175.
- [26] Green, E. D., Adelt, G., Baenziger, J. U., Wilson, S., & Van Halbeek, H. (1988). The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz ^1H NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(34), 18253-18268.

- [27] Kurosawa, N., Hamamoto, T., Inoue, M., & Tsuji, S. (1995). Molecular cloning and expression of chick Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1244(1), 216-222.
- [28] Grahn, A., Barkhordar, G. S., & Larson, G. (2003). Identification of seven new α 2, 3-sialyltransferase III, ST3Gal III, transcripts from human foetal brain. *Glycoconjugate Journal*, 20(7-8), 493-500.
- [29] Tarp, M. A., & Clausen, H. (2008). Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(3), 546-563.
- [30] Hokke, C. H., Bergwerff, A. A., Dedem, G. W., Kamerling, J. P., & Vliegenthart, J. F. (1995). Structural analysis of the sialylated N - and O - linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in chinese hamster ovary cells. *European Journal of Biochemistry*, 228(3), 981-1008.
- [31] Rapp, J. C., Harvey, A. J., Speksnijder, G. L., Hu, W., & Ivarie, R. (2003). Biologically active human interferon α -2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Research*, 12(5), 569-575.
- [32] Fahy, J. V., & Dickey, B. F. (2010). Airway mucus function and dysfunction. *New England Journal of Medicine*, 363(23), 2233-2247.
- [33] McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., & Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 265-278.
- [34] Ito, T., Suzuki, Y., Takada, A., Kawamoto, A., Otsuki, K., Masuda, H., Yamada, M., Suzuki, T., Kida, H., & Kawaoka, Y. (1997). Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *Journal of Virology*, 71(4), 3357-3362.

Table 3-1

ニワトリ ST のクローニングプライマーセット

A) クローニングに用いたプライマーセット

成鳥脳もしくはブラストダームより取得した cDNA をテンプレートとし、以下のプライマーを用いてクローニングを行った。下線部は制限酵素サイトを示しており、対応する制限酵素を使用して pcDNA4/TO/myc-HisA ベクターに挿入した。安定発現のために開始コドンの前に kozak 配列を加え、3'末端側には検出用に 6×His タグを付加した。

sequence (5'→3')		
chicken	dir	AAAG <u>AATTC</u> ACCATGGTCACCGTCAGGAAAAGG
ST3Gal1	rev	AAACTCGAGTCTGCCCTTGAAAAATTTTAT
chicken	dir	AAAGGATCC <u>ACCAT</u> GAAGTGCTCGCTGCGCGTC
ST3Gal2	rev	AAACTCGAGATTGCCCCGGTACACCTCAAT
chicken	dir	AAAGGATCC <u>ACCAT</u> GAGAAGACCAATCTGGTTT
ST3Gal5	rev	AAACTCGAGGCTGTCTTTGTTGCAGAATTC
mouse	dir	AAAG <u>AATTC</u> ACCATGCACACAGAGGCGGTGGGC
ST3Gal5	rev	AAACTCGAGGTGGATGCCGCCGCTGAGGTC

B) 参照したシーケンスデータ

NCBI に登録されている配列について、下記を参考にクローニングを行った。

	ST3Gal1	NM_205217
chicken	ST3Gal2	NM_204480
	ST3Gal5	NM_001001192
mouse	ST3Gal5	NM_001035228

Table 3-2

qRT-PCR で用いたプライマーセット

発現解析では以下のプライマーセットを使用した。ST3Gal3, 4, 6 及び ST6Gal1, 2 のプライマーは、既報^[18]で用いられた配列を使用した。GAPDH は mRNA と genome DNA 解析で同じプライマーを使用した。増幅配列が異なるため区別は可能である。

		sequence (5'→3')
chicken ST3Gal1	dir	CCTTCCACAGGCCTTCTTTCT
	rev	ACACCTGTCTGTCTCGGAAAGC
chicken ST3Gal2	dir	ATGAGGTGAACGTCTTCGGG
	rev	CAGCATGTCTGATGATGTGCG
chicken ST3Gal3	dir	TCCCAAAGTTCTCGAAGCCG
	rev	GGCAGCTGAGACTGTCAAGA
chicken ST3Gal4	dir	AAGAAAACAAGACCGTATGTCCC
	rev	CGTCCTCACCCAGAAGTAATC
chicken ST3Gal5	dir	GAGACAGCCTTGGACATCCT
	rev	GATGTGTGGCCAGAACGACT
chicken ST3Gal6	dir	GGAGAGAAGGAACGCCCTAA
	rev	ACTGGCACACAGGAACGG
chicken ST6Gal1	dir	TGGGTCGCTGTGCTGTT
	rev	TGGGAGTTGACAAGACGAATC
chicken ST6Gal2	dir	TCTCACCAACCCAAACCATCA
	rev	TCCGGCTTCTTATAACCACACA
chicken GAPDH	dir	GGGCACGCCATCACTATC
	rev	GTGAAGACACCAGTGGACTCC

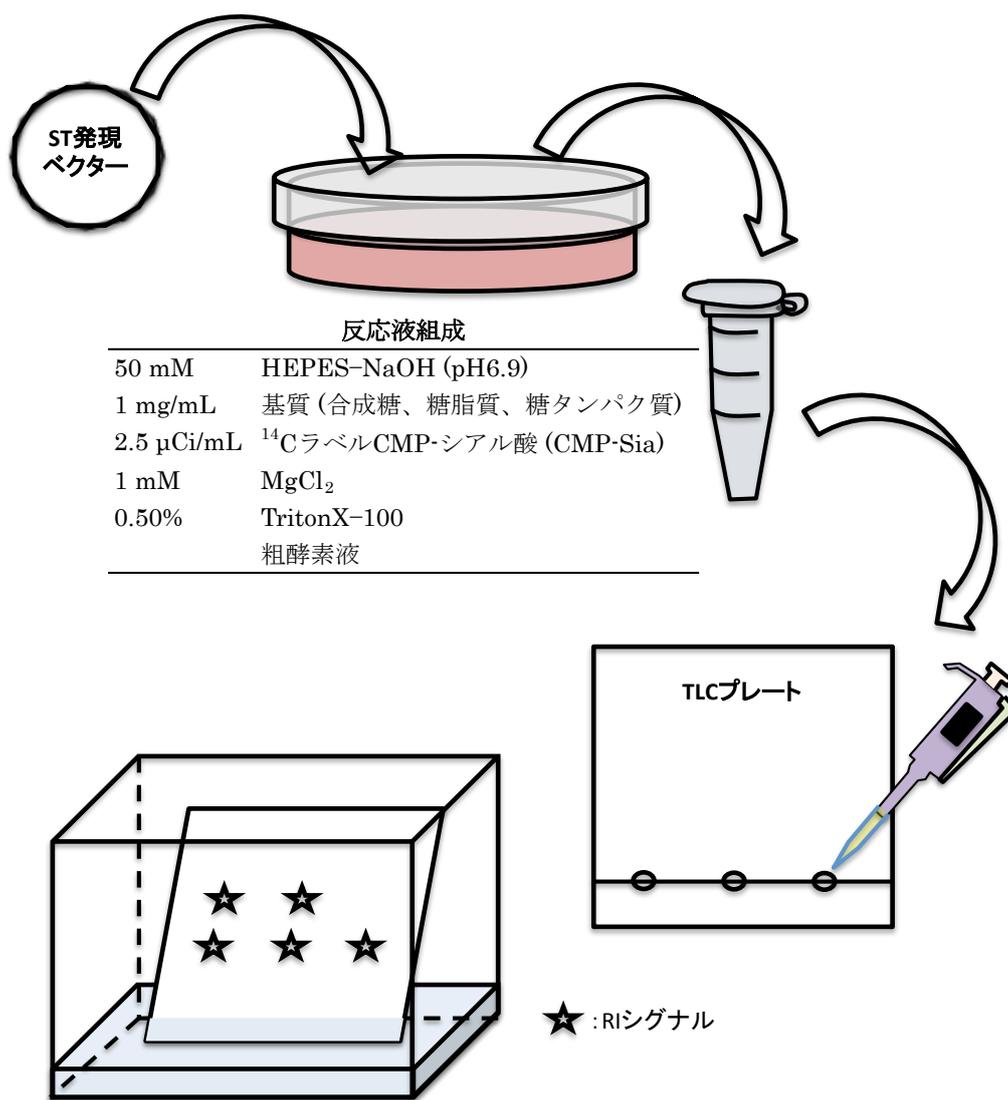


Fig. 3-1

in vitro での ST 活性測定

293FT 細胞に ST 発現ベクターをトランスフェクションして 48 時間培養し、得られた細胞懸濁液を粗酵素液として使用した。図中に示した組成通りに反応液を調製して 37°C で一晩転移反応を行い、反応液をシリカプレート (TLC プレート) にスポットしてから展開液を用いて展開した。IP プレートを用いて RI シグナルを検出し、イメージアナライザーにて解析した。

Fig. 3-2

ニワトリ ST3Gal1 の哺乳類オルソログとのアミノ酸アラインメント

ニワトリ ST3Gal1 の DNA シーケンスを確認し、哺乳類 ST3Gal1 とのアミノ酸配列の相同性を解析した。G. gallus cloned; 今回クローニングしたニワトリ ST3Gal1、G. gallus variant; 今回クローニングしたニワトリ ST3Gal1 (スプライシングバリエーション)、G. gallus; NCBI で報告されているニワトリ配列、H. sapiens; ヒト、M. musculus; マウス、B. taurus; ウシ

Comparison of ST3Gal2 amino acid sequences

Gallus gallus cloned	1	MKCSLRVCFLSTAFLLI FVMSV LFTYSHHSI R---YLDP DG LGGI HRVKLVPGYAGVRRIL
Gallus gallus registered	1	MKCSLRVCFLSTAFLLI FVMSV LFTYSHHSI R---YLDP DG LGGI HRVKLVPGYAGVRRIL
Homo sapiens	1	MKCSLRVWFLSMVAFLLVFI 1SLLFTYSHHSMATLPYLDSGALDGT HRVKLVPGYAGLQRL
Mus musculus	1	MKCSLRVWFLSMVAFLLVFI 1SLLFTYSHHSMATLPYLDSGALGGT HRVKLVPGYSGLQRL
Bos taurus	1	MKCSLRVWFLSMVAFLLVFI 1SLLFTYSHHSTATLPYLDSGALDGP RVKLVPGYAGLQRL
G. gallus cloned	58	SHGVPYPRG CACRRCPEDAFAAAA JFDSRYDGGVSPVWTKENME LPPDVQRWMMMLQPQ
G. gallus	58	SHGVPYPRG CACRRCPEDAFAAAA JFDSRYDGGVSPVWTKENME LPPDVQRWMMMLQPQ
H. sapiens	61	SKERLSGKSCACRRCMGDAGASD-- JFDSHF DGN I SPVWTR ENMD LPPDVQRWMMMLQPQ
M. musculus	61	GKEGLSIN CACSRCMGDASTSE-- JFDSHF DGN I SPVWTR ENMD LPPDVQRWMMMLQPQ
B. taurus	61	SKERLAKSKCACRRCMGDTGASE-- JFDSHFNS I SPVWTR ENMD LPPDVQRWMMMLQPQ
G. gallus cloned	118	FKSHNTQEVLS KLFQ I VPGENPYRWRDPH CRRCVAVGNSGNLRGSGYGH E I DGHD F I MR
G. gallus	118	FKSHNTQEVLS KLFQ I VPGENPYRWRDPH CRRCVAVGNSGNLRGSGYGH E I DGHD F I TR
H. sapiens	119	FKSHNTNEVLEKLFQ I VPGENPYRFRDPH CRRCVAVGNSGNLRGSGYGD V DGHN F I MR
M. musculus	119	FKSHNTNEVLEKLFQ I VPGENPYRFRDPD CRRCVAVGNSGNLRGSGYGD E VDS HN F I MR
B. taurus	119	FKSHNTNEVLEKLFQ I VPGENPYRFRDPR CRRCVAVGNSGNLRGSGYGF D VDGHN F I MR
		L
G. gallus cloned	178	1NQAPT VGFEG DVGSRTTHHFMYPE SAKNLPANVSFVLVPFKT L DLLW I ASALSTGQ I RF
G. gallus	178	1NQAPT VGFEG DVGSRTTHHFMYPE SAKNLPANVSFVLVPFKT L DLLW I ASALSTGQ I RF
H. sapiens	179	1NQAPT VGFEG DVGSRTTHHFMYPE SAKNLPANVSFVLVPFKV L DLLW I ASALSTGQ I RF
M. musculus	179	1NQAPT VGFEG DVGSRTTHHFMYPE SAKNLPANVSFVLVPFKA L DLLW I ASALSTGQ I RF
B. taurus	179	1NQAPT VGFEG DVGSRTTHHFMYPE SAKNLPANVSFVLVPFKA L DLLW I ASALSTGQ I RF
		L
G. gallus cloned	238	TYAPVKPFLAVDKEK VQ I YNPAFFKY I HDRWTEHHGRYPSTGMLV LFFALHVCDEVN VFG
G. gallus	238	TYAPVKPFLAVDKEK VQ I YNPAFFKY I HDRWTEHHGRYPSTGMLV LFFALHVCDEVN VFG
H. sapiens	239	TYAPVKSFLAVDKEK VQ I YNPAFFKY I HDRWTEHHGRYPSTGMLV LFFALHVCDEVN VYG
M. musculus	239	TYAPVKSFLAVDKEK VQ I YNPAFFKY I HDRWTEHHGRYPSTGMLV LFFALHVCDEVN VYG
B. taurus	239	TYAPVKSFLAVDKEK VQ I YNPAFFKY I HDRWTEHHGRYPSTGMLV LFFALHVCDEVN VYG
		S
G. gallus cloned	298	FGADSRGNWHHYWENNRVAGEFRKTGVH DADFEAH I DMLAKTBR I EVYRGN
G. gallus	298	FGADSRGNWHHYWENNRVAGEFRKTGVH DADFEAH I DMLAKTBR I EVYRGN
H. sapiens	299	FGADSRGNWHHYWENNRVAGEFRKTGVH DADFEAH I DMLAKASK I EVYRGN
M. musculus	299	FGADSRGNWHHYWENNRVAGEFRKTGVH DADFEAH I DMLAKASK I EVYRGN
B. taurus	299	FGADSRGNWHHYWENNRVAGEFRKTGVH DADFEAH I DMLAKASK I EVYRGN
		S -III- -VS-

Fig. 3-3

ST3Gal2 の他の生物由来のオルソログとのアラインメント

ニワトリ ST3Gal2 の DNA シーケンスを確認し、哺乳類 ST3Gal2 とのアミノ酸配列の相同性を解析した。G. gallus cloned; 今回クローニングしたニワトリ ST3Gal2、G. gallus; NCBI で報告されているニワトリ配列、H. sapiens; ヒト、M. musculus; マウス、B. taurus; ウシ

Comparison of ST3Gal5 amino acid sequences

Gallus gallus cloned	1	-----	1RR
Gallus gallus registered	1	-----	1RR
Homo sapiens(M3-SAT-I)	1	-----	1RR
Mus musculus	1	-----	1RR
Bos taurus	1	MRKKRAGGAERRPLKPRTEAAAAAPAGRAMPSDHSRMKLRDCSRPSLQWYTRAQNK	1RR
G. gallus cloned	4	P I W F L K G T R K F L A L F V I S G C F L Y I L K L H F Y P E E C D R T K T P V V D F D R V K R A Q Q V A S A V L Q	
G. gallus	4	P I W F L K G T R K F L A L F V I S G C F L Y I L K L H F Y P E E C D R T K T P V V D F D R V K R A Q Q V A S A V L Q	
H. sapiens	4	P S L L K D I L K C T L L V F G V W I L Y I L K L N V T T E E C D M K K M H V V D P D H V K R A Q K V A Q Q V L Q	
M. musculus	4	P S L L I K D I C K C T L V A F G V W L L Y I L I L N V T A E E C D M K R M H V V D P D R I K R A Q S V A Q E V L Q	
B. taurus	61	P N L L L K D I L K C T L L L F G V W I L F Y I L K L N H T T E E C D M K R M P Y M D P D R I K R A Q Q V A Q Q V L Q	
G. gallus cloned	63	E Q C R P S V K K A M G K L F A E K V S M D I P P F V G K N I D D E A L F K Y G P P F G F H R F F D K L K K L E L	
G. gallus	63	E Q C R P S V K K A M G K L F A E K V S M D I P P F V G K N I D D E A L F K Y G P P F G F H R F F D K L K K L E L	
H. sapiens	62	K E C R P K F A K T S M A L F E H R Y S V D L L P F V Q K A P K D S E A E S K Y D P P F G F R K F S S K V Q T L E L	
M. musculus	62	K E C R P P V A K T M A L F E D R Y S I N L E P F V Q K V P T A S E A E L K Y D P P F G F R K F S S K V Q S L D M	
B. taurus	120	K E C R P D F A K S M A Q L G S R Y S L D L P P F V T K V P A E S E A E V K Y D P P F G F R K F S G K V Q T L E L	
G. gallus cloned	123	L P E H D L P E D L K S K H C K R C V V I G S G G I L V S S E L G H L N Q Y D I V I R L N D A P V Q S V T D H V G N K	
G. gallus	123	L P E H D L P E D L K S K H C K R C V V I G S G G I L V S S E L G H L N Q Y D I V I R L N D A P V Q S V T D H V G N K	
H. sapiens	122	L P E H D L P E H L K A K T D R C V V I G S G G I L A G L E L G H T N Q F D V V I R L N S A P V E G Y S E H V G N K	
M. musculus	122	L P E H D F P E H L R A K A C K R C V V G N G G I L H G L E L G H A N Q F D V V I R L N S A P V E G Y S E H V G N K	
B. taurus	180	L P E H D F P E H L R A K S C K H C V V I G S G G I L H G L E M G H A N Q F D V V I R L N N A P V E G Y S E H V G N K	
G. gallus cloned	183	T T I R M T Y P E G A P L S E H E V P P A S L F V A V L F K S V D F N W L Q A M V K N E T L S L I I R L F F W K E V A K	
G. gallus	183	T T I R M T Y P E G A P L S E H E V P P A S L F V A V L F K S V D F N W L Q A M V K N E T L S L I I R L F F W K E V A K	
H. sapiens	182	T T I R M T Y P E G A P L S D L E V Y S N D L F V A V L F K S V D F N W L Q A M V K E T L P F W V R L F F W K Q V A E	
M. musculus	182	T T I R M T Y P E G A P L S D M E V Y A N D L F V T V L F K S V D F K I L Q A M V K N E S L P F W V R L F F W K Q V A E	
B. taurus	240	T T I R M T Y P E G A P L S D L E V Y S S D L F V T V L F K S V D F N W L Q A M V K N E T L P F W V R L F F W K Q V A E	
G. gallus cloned	243	K I P F T S K Q F R I L N P V I V K E T A L D I L E F P K P R S I F W G W D K N V P T I G V I A V V L A T H L C D E V S	
G. gallus	243	K I P F T S K Q F R I L N P V I V K E T A L D I L E F P K P R S I F W G W D K N V P T I G V I A V V L A T H L C D E V S	
H. sapiens	242	K I P L Q P K H F R I L N P V I I K E T A F D I L Q Y S E P Q S R F W G R D K N V P T I G V I A V V L A T H L C D E V S	
M. musculus	242	K V P L Q P K H F R I L N P V I I K E T A F D I L Q Y S E P Q S R F W G H D K N I P T I G V I A V V L A T H L C D E V S	
B. taurus	300	K I P L Q P K Q F R I L N P V I I K E T A F D I L Q Y S E P Q S R F W G R D K N V P T I G V I A V V L A T H L C D E V S	
G. gallus cloned	303	I A G F G Y D L N Q P S T P L H Y V N L C H A A M I N R D T M H N V T G E T K L L Q K L V K E K V V K D L T S G I H C E	
G. gallus	303	I A G F G Y D L N Q P S T P L H Y V N L C H A A M I N R D T M H N V T G E T K L L Q K L V K E K V V K D L T S G I H C E	
H. sapiens	302	L A G F G Y D L N Q P R T P L H Y F D S Q C H A A M I N F D T M H N V T T E T K F L L K L V K E G V V K D L S G G I D R E	
M. musculus	302	L A G F G Y D L S Q P R T P L H Y F D S Q C H G A M H W D V M H N V T T E T K F L L K L L K E G V V E D L S G G I H --	
B. taurus	350	L A G F S V A L N Q P R T P L H Y F D N L C H A A M I N F D T M H N V T T E T N F L L K L V R E G V V R D L S G G I H S E	
G. gallus cloned	363	F C N K D S	
G. gallus	363	F C N K D S	
H. sapiens	362	F-----	
M. musculus	359	-----	
B. taurus	420	F-----	

Fig. 3-4

ST3Gal5 の他の生物由来のオルソログとのアラインメント

ニワトリ ST3Gal5 の DNA シーケンスを確認し、哺乳類 ST3Gal5 とのアミノ酸配列の相同性を解析した。G. gallus cloned; 今回クローニングしたニワトリ ST3Gal2、G. gallus; NCBI で報告されているニワトリ配列、H. sapiens; ヒト、M. musculus; マウス、B. taurus; ウシ

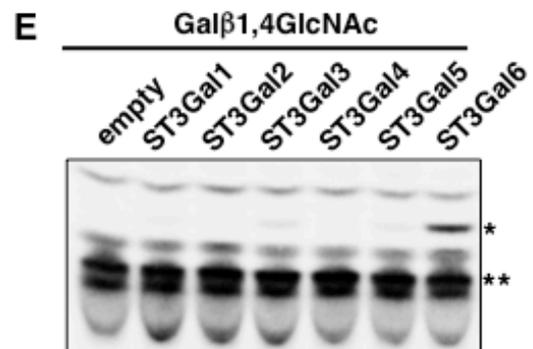
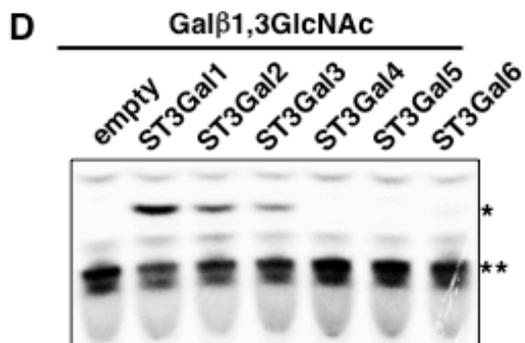
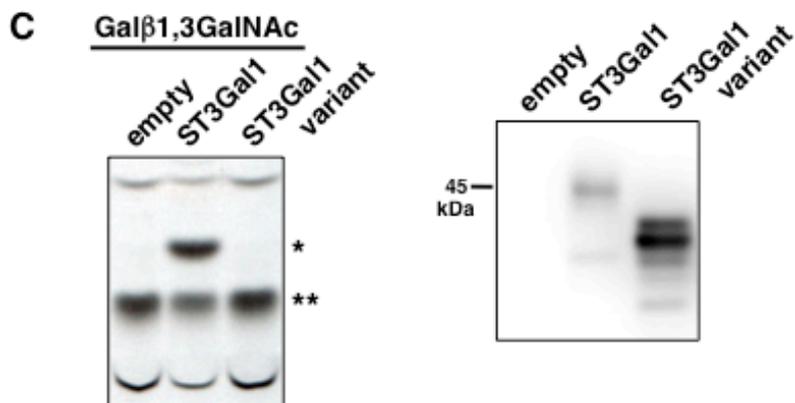
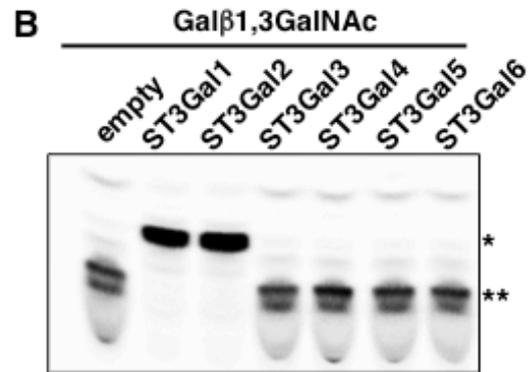
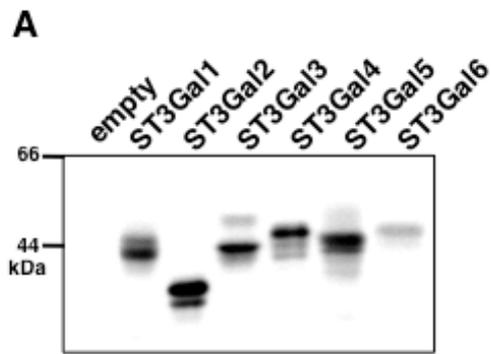


Fig. 3-5

in vitro でのニワトリ ST の活性測定

- A) 293FT 細胞に発現させたニワトリ ST を、抗 His 抗体を用いたウェスタンブロットにて検出した。ここで得られた粗酵素液は以降の実験 (Fig. 3-5B ~E、Fig. 3-6) で使用した。
- B) O型糖鎖基質である Gal-β1,3-GalNAc に対する活性測定。
*; Sia-α2,3-Gal-β1,3-GalNAc、**; CMP-Sia
- C) 左パネル: O型糖鎖基質 Gal-β1,3-GalNAc に対する ST3Gal1 スプライシングバリエーションの活性測定。
*; Sia-α2,3-Gal-β1,3-GalNAc、**; CMP-Sia
右パネル: 抗 His 抗体を用いたウェスタンブロットによるニワトリ ST の発現確認。
- D) ST による N型糖鎖合成反応の比較的まれな基質である Gal-β1,3-GlcNAc に対する活性測定。
*; Sia-α2,3-Gal-β1,3-GlcNAc、**; CMP-Sia
- E) ST による N型糖鎖合成反応の主要な基質である Gal-β1,4-GlcNAc に対する活性測定。
*; Sia-α2,3-Gal-β1,4-GlcNAc、**; CMP-Sia

これらの図は、3回の独立した実験のうちの1つを示している。

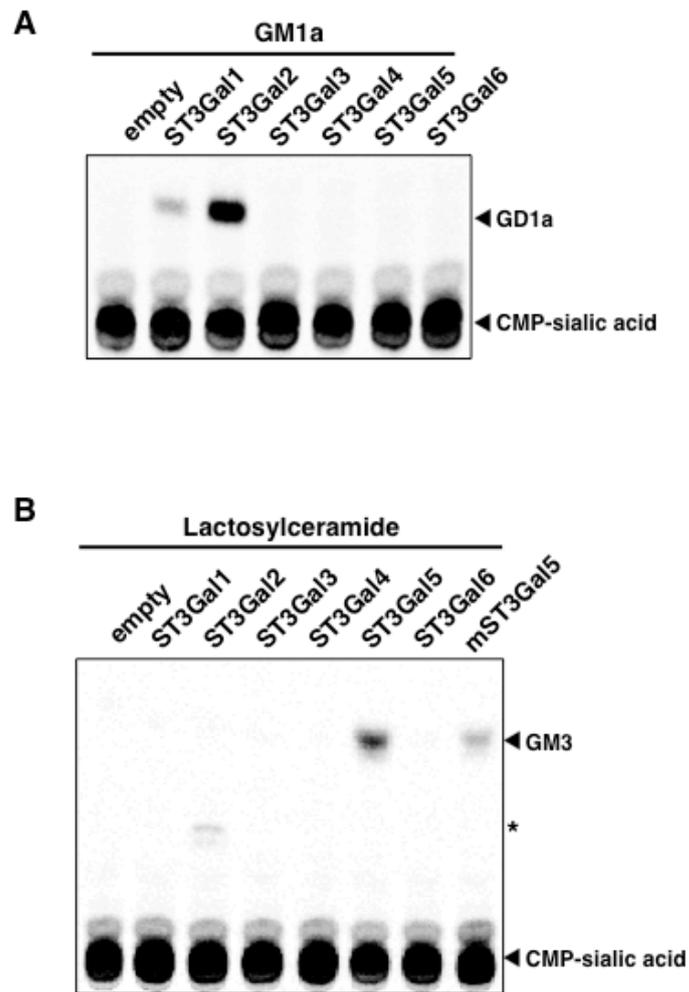


Fig. 3-6
糖脂質（ガングリオシド）に対するニワトリ ST の活性測定

- A) GM1a に対する活性測定。
 B) Lactosylceramide に対する活性測定。
 *; 非特異バンド

これらの図は、3回の独立した実験のうちの1つを示している。

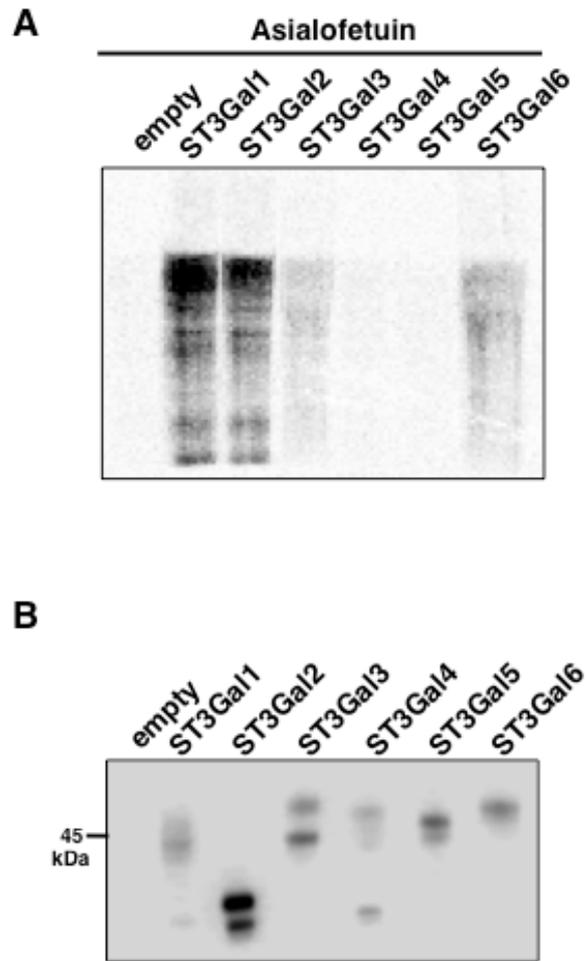


Fig. 3-7

糖タンパク質（アシアロフェツイン）に対するニワトリ ST の活性測定

A) アシアロフェツインに対する活性測定。

B) 293FT で発現させたニワトリ ST は、抗 His 抗体を用いたウェスタンブロットにより発現解析した。

これらの図は、3回の独立した実験のうちの1つを示している。

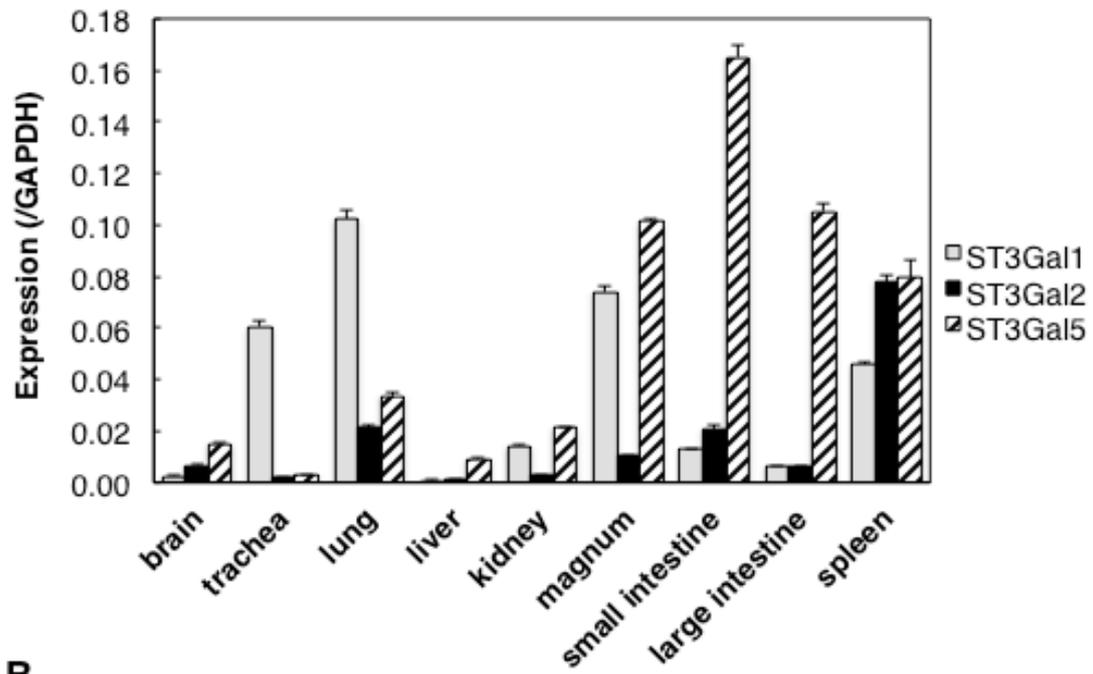
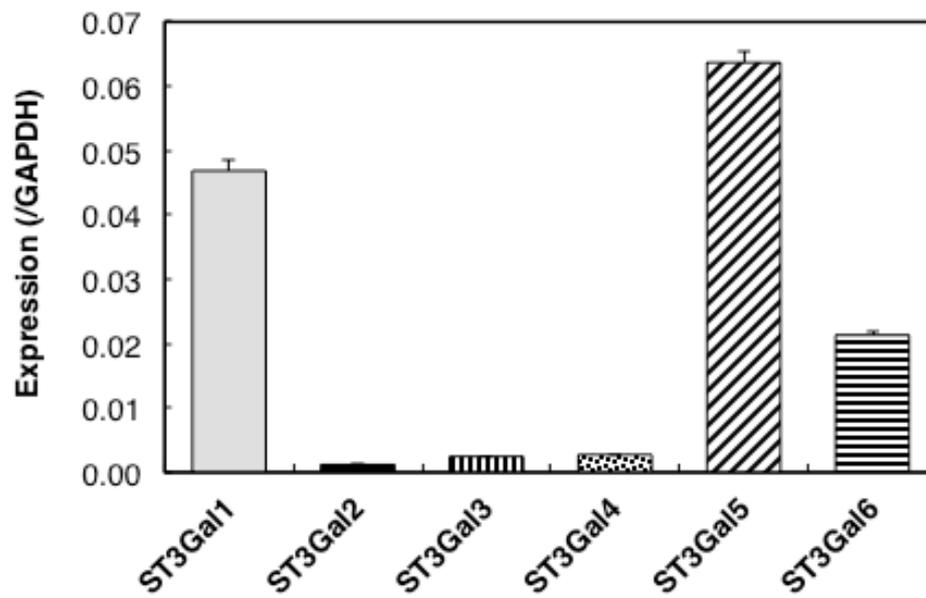
A**B**

Fig. 3-8

ニワトリ成鳥における各組織での ST 発現解析 (qRT-PCR)

ST 発現レベルはスタンダードカーブを用いてコピー数を算出し、GAPDH コピー数に対する発現比で評価した。スタンダードカーブには制限酵素でリニアにしたプラスミドを使用し、以降の qRT-PCR でも同様に用いた。

平均値及び標準誤差は独立した 3 回の実験により得られた値から算出した。

A) 成鳥ニワトリ組織での発現解析

brain; 脳、trachea; 気道、lung; 肺、liver; 肝臓、kidney; 腎臓、magnum;
輸卵管、small-intestine; 小腸、large-intestine; 大腸、spleen; 脾臓

B) 輸卵管上皮細胞 TGC における発現解析

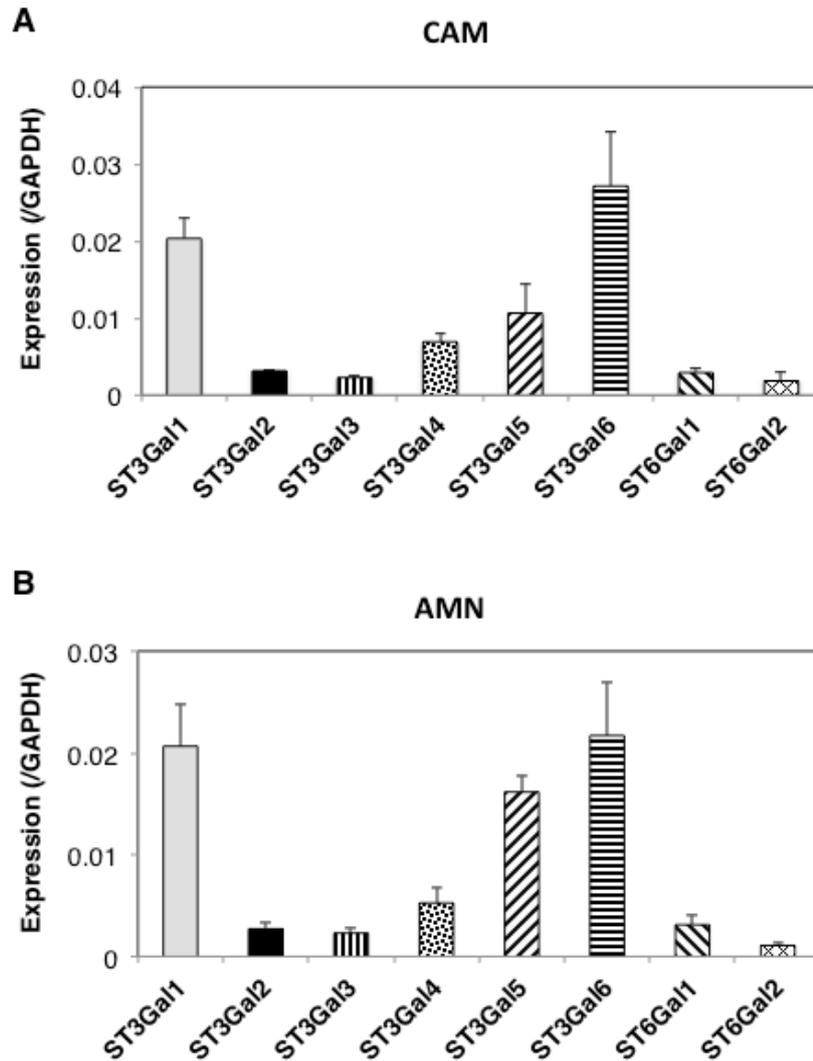


Fig. 3-9

漿尿膜及び羊膜におけるニワトリ ST の発現解析

3 個の発育鶏卵からそれぞれ漿尿膜と羊膜を取得し、qRT-PCR によりニワトリ ST3Gal 及び ST6Gal について発現解析を行った。

平均値及び標準誤差は独立した 3 回の実験により得られた値から算出した。

A) 漿尿膜 (CAM)

B) 羊膜 (AMN)

謝辞

STの活性測定は、名古屋大学アイソトープ総合センターの設備を利用して行いました。丁寧な技術支援も賜りましたことを、この場を借りて御礼申し上げます。

第 4 章

結言

本論文で明らかにした結果について以下に示す。

第1章では本研究の目的とバックグラウンドについて述べた。

第2章では、有用タンパク質を生産する遺伝子組換えニワトリの取得効率上昇を目指し、ニワトリの持つ自然免疫関連因子のうち IFITM に着目して解析を行った。まずニワトリ成鳥では肺で IFITM3 の発現が最も高いことが示され、大腸では IFITM1 が特異的に高く、次いで IFITM3 が発現していることも分かった。次に IFN 誘導性を解析したところ、IFITM3 は IFN- α に対して強い誘導性が観察された。さらに、発現解析が行われていなかったニワトリ胚組織における IFITM の発現は、生殖腺で IFITM3 が高いことが明らかとなった。生殖腺に定着する PGC についても解析を行ったところ、分化に伴って IFITM3 の発現が低下することが明らかとなり、現行の遺伝子導入法はステージ中最も IFITM3 の発現が高いタイミングで行っていることが示唆された。現行遺伝子導入タイミングにおける IFITM3 の影響を明らかにするために株化細胞 DF-1 を用いて感染実験を行ったところ、IFITM3 をノックダウンすることで VSV-G シュードタイプのウイルス感染が促進することを明らかにした。最後に、鶏卵における IFITM の発現を解析したところ、漿尿膜及び羊膜で IFITM3 の発現が高いことがわかった。これらの結果から、胚時期における IFITM3 の発現制御による遺伝子組換えニワトリ及びワクチン取得の効率化の可能性が示されたと考える。

第3章では生産させた有用タンパク質の糖鎖制御とワクチン取得の効率化を目指し、ニワトリシアル酸転移酵素 ST の機能解析を行った。まずは広範な合成糖基質を用いて ST 活性を解析したところ、ニワトリ ST は哺乳類同様の活性を持つことが明らかとなった。特に、ST3Gal1, 2 は O 型糖鎖合成だけでなく部分的に N 型糖鎖合成に関与する可能性が示唆された。また、ST3Gal1 にはスプライシングバリエントも認められたが、活性は失っていることがわかった。次に糖脂質を基質として用いたところ、GM1a に対しては ST3Gal1, 2 が、ラクトシルセラミドに対しては ST3Gal5 のみが活性を示した。さらに糖タンパク質アシアロフェツインを基質として用いたところ、ST3Gal1, 2, 3, 6 が活性を示した。このように、ニワトリ ST について広範な基質に対する活性を明らかにすることができた。最後に ST の発現解析を行ったところ、成鳥組織では哺乳類とは異なり ST3Gal5 が腸管と輸卵管で高いという特徴が観察された。また、輸卵管において分泌を担う輸卵管上皮細胞について ST の発現を解析し

たところ、ST3Gal1, 5, 6が高いことが示された。さらに、発育鶏卵中の漿尿膜及び羊膜ではST3Gal1, 5, 6の発現は高かったがST6Galの発現は低く、鶏卵中では α 2,3結合のシアル酸が主であることが示唆された。これらの結果から、ニワトリ成鳥組織（特に輸卵管）におけるSTの発現制御により、ニワトリを用いた有用タンパク質の生産系で糖鎖制御が改善できる可能性を示した。また、発育鶏卵におけるSTの発現制御によるワクチン取得の効率化の可能性が示されたと考える。

以上、本論文で得た結果はニワトリを用いたタンパク質生産系の構築・改善及びワクチン取得の効率化に向けて新たな可能性を示すことができたと考える。

投稿論文

学位論文で使用した論文

第2章

Kidani, S., Okuzaki, Y., Kaneoka, H., Asai, S., Murakami, S., Murase, Y., Iijima, S. & Nishijima, K. I. (2016). Expression of interferon-inducible transmembrane proteins in the chicken and possible role in prevention of viral infections. *Cytotechnology*, DOI: 10.1007/s10616-016-9958-1

第3章

Kidani, S., Kaneoka, H., Okuzaki, Y., Asai, S., Kojima, Y., Nishijima, K. I., & Iijima, S. (2016). Analyses of chicken sialyltransferases related to O-glycosylation. *Journal of bioscience and bioengineering* in press DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.03.017

その他の論文

[1] Tsuge, M., Masuda, Y., Kaneoka, H., Kidani, S., Miyake, K., & Iijima, S. (2013). SUMOylation of damaged DNA-binding protein DDB2. *Biochemical and biophysical research communications*, 438(1), 26-31.

[2] Okino, Y., Inayoshi, Y., Kojima, Y., Kidani, S., Kaneoka, H., Honkawa, A., Higuchi, H., Nishijima, K. I., Miyake, K., & Iijima, S. (2012). Moloney murine leukemia virus integrase and reverse transcriptase interact with PML proteins. *Journal of biochemistry*, 152(2), 161-169.

謝辞

本研究は、名古屋大学大学院 工学研究科 化学生物工学専攻 生物機能工学分野 バイオテクノロジー講座 遺伝子工学研究室にて行われました。研究の遂行、本論文の執筆にご協力賜りました全ての方々に感謝と御礼を申し上げます。

研究遂行にあたり、遺伝子工学研究室 飯島信司教授には実験に対する多大な助言だけでなく、研究の膨らませ方など自身が研究者としてあるべき姿についても指導を賜りました。大変お世話になりましたことを心より御礼申し上げます。同研究室 西島謙一准教授には、データ解析の解釈や学会での準備、マウスを用いた実験などご助力を頂きましたこと深く感謝いたします。同研究室 金岡英徳助教には、アイソトープを用いた実験や、より綺麗で正確な結果を得るための実験技術の指導を頂きましたこと御礼申し上げます。同研究室 元准教授である三宅克英教授（現 石川県立大学）には、研究室配属当初に実験技術の指導を頂き、誠にありがとうございました。先生方には、最後までご迷惑とお手数をおかけし、お世話になりっぱなしでした。至らない私ですから、先生方の指導と御助力無しには、こうして本論文を執筆することはできなかったと思います。改めて、心よりお詫びするとともに、重ねて御礼を申し上げます。

名古屋大学大学院 工学研究科 本多裕之教授ならびに生命農学研究科 北島健教授には、お忙しいにも関わらず本論文を査読いただき、有用な助言も賜りました。御礼申し上げます。

研究室生活の中でお世話になった先輩、同期、後輩に心より感謝いたします。特に沖野雄気氏、小島祐介氏には実験技術指導を頂き、大変お世話になりました。多々ご迷惑をおかけしたことと思います。また、自身も忙しいにも関わらず快く実験に協力して下さった奥寄雄也氏、森脇脩一郎氏、村上晴太郎氏、浅井聖也氏に感謝申し上げます。

グリーン自然科学国際教育プログラムには、経済的な支援だけでなく英会話学習の機会や他研究科所属の学生との交流機会を頂き、誠にありがとうございました。

最後に、私を支えてくれた家族と妻である未来に感謝いたします。

2016年8月吉日

木溪 俊介 記