

鳥類の大規模糖鎖解析による 感染症予防データベースの構築

天野 麻穂 [北海道大学大学院先端生命科学研究所
／特任助教]

山田 雅雄 [株式会社GPバイオサイエンス／技術・
海外営業技術担当取締役]

背景・目的

生体内において複合糖質は、免疫など基本的な生命現象において、重要な役割を担っている。生物種ごとの糖鎖構造の多様性は、感染防御などに適応していくために獲得されたと考えられている。

本研究では、北海道各地の養鶏場で飼育されたニワトリ卵白および体組織について、グライコブロットティング法を用いた網羅的・定量的な糖鎖解析(グライコミクス)を実施する。さらに、レクチンアレイを用いて、シアル酸の結合様式を決定する。得られた糖鎖情報をデータベース化することで、感染症予防に役立てることを目的とする。なお、グライコブロットティング法とレクチンアレイを組み合わせた研究成果は世界初である。

内容・方法

試料は、乾燥卵白各1.5mg(乾燥重量)、アイガモおよびニワトリ由来の気管・結腸各上皮細胞ライセート500μg(タンパク量)を用いた。グライコミクスは、グライコブロットティング法により実施した。

試料は、定法に従って前処理した(Hirose K, *et al.*, *Biochemistry*, 50: 4757-74(2011))。すなわち、各試料を重炭酸アンモニウムで懸濁後、還元アルキル化を行った。トリプシン処理を施した後、ペプチドN-グリカナーゼ処理により、N-結合型糖鎖を特異的に遊離した。この反応液をBlotGlycoHビーズを用いたグライコブロットティングに供した。グライコブロットティングは、定法に則り行った。得られた糖鎖はMALDI-TOF/MSにより検出し、GlycomodtoolおよびGlycosuite DBにより構造を推定した。定量は、濃度既知の内部標準物質のピークエリア面積比から計算した。

結合様式や絶対構造の帰属は、レクチンマイクロアレイにアプライすることで決定した。レクチンマイクロアレイを使った糖鎖プロファイリングは、定法通りに実施した(A. Kuno *et al.*, *Nature Methods*: 2, 851-856, 2005)。

結果・成果

(1) N-グライコミクス

グライコブロットティング法により、①道内養鶏場7か所(斜里町、帯広市、白老町、士別市、森町、北広島市、江別市)の6種のニワトリ(もみじ、さくら、ボリスブラウン、軍鶏、アローカナ)それぞれの卵白、②アイガモとニワトリの気管および結腸の各上皮細胞画分のライセー

トについてN-グライコミクスを実施した。

①について、検出される糖鎖は25~35種程度で、検出される糖鎖構造には、ニワトリ種ごとに大きな相違はないが、発現量については差がみられる可能性が示唆された。

②について、アイガモ・ニワトリ双方において、気管よりも結腸のほうが検出される糖鎖総量が数倍程度多いことが判明した。

現在、再現性を取得するための実験を行っているところである。

(2) レクチンアレイ解析

(1) ①、②について、レクチンアレイ解析を行い、シアル酸の結合様式について調べた。レクチンチップにアプライする各サンプル溶液のタンパク質濃度の31.25-2000 ng/mLの7段階希釈列を作成し、検出に適切なサンプル濃度と検出器のgainの条件を、各レクチンとサンプルのbinding curveを描くことにより決定した。その結果をまとめたものが、下の表1である。このサンプル濃度を使用し、①および②のすべてのサンプルのデータを取得した。現在、データ解析を進めているところである。

表1. レクチンチップにアプライするサンプルの適性濃度と検出器のgain

	サンプル濃度(ng/mL)	gain
ニワトリ気管上皮細胞	500	115
ニワトリ腸管上皮細胞	500	125
アイガモ気管上皮細胞	500	125
ニワトリ腸管上皮細胞	250	115
卵白各種	500	115

以上の結果から、同一種のニワトリであっても、養鶏場の所在地、すなわち生息地によって卵白のN-グライコームが変化する可能性が考えられた。試料の影響や渡り鳥の飛来の影響など、情報解析を進めているところである。

今後の展望

3. (1)、(2)で得られた結果について、データ解析および情報解析を進めているところである。今後、データを蓄積し、データベースを作成、ライブラリ化へとつなぐ。高病原性鳥インフルエンザは、ニワトリなどの家禽類に感染すると非常に高い病原性をもたらすため、養鶏業の脅威となっている。道内においては、まだ養鶏場における鳥インフルエンザの発生被害は出ていないが、近年は飛来した白鳥がH5N1型インフルエンザにより死亡するなどしており、いつ感染鶏が出てもおかしくない状況である。このような状況下、「どのような飼料や管理温度のもとで飼育すると、どのような糖鎖が発現しやすく、さらにどのような病原体のキャリアとなりやすくなるのか」について、データベース化・ライブラリ化し、参照しながら飼育することで、道産の家禽を疾患から未然に守ることが可能になる。