

シアル酸を過剰発現した細胞株の樹立とその応用
—インフルエンザウイルス感染を鋭敏に検出するツールの開発—
Establishment of cell lines overexpressing sialic acid and its application
—Development of a sensitive tool to detect influenza virus infection—

○柿沼俊光¹, 上宮悠², 山口玲香³, 鈴木佑典⁴, 櫛泰典⁴

*Toshihiro Kakinuma¹, Hisashi Kamimiya², Reika Yamaguchi³, Yuusuke Suzuki⁴, Yasunori Kushi⁴

Abstract: Sialic acids are present in a variety of mammalian glycoproteins and glycosphingolipids (GSLs), usually at the terminal positions of carbohydrate chains. These chains play critical roles in biological phenomena such as cell-cell recognition, neurite outgrowth and virus infection. The sialic acids are transferred to carbohydrate chains by specific sialyltransferases (STs) in the cell. Therefore, the STs are considered to be key enzymes in biosynthesis of sialylated-glycoconjugates. In this report, we aim to establish cell lines overexpressing sialic acids using sialyltransferase from marine bacteria, and develop as a tool to detect the influenza virus infection.

1. はじめに

高等動物の細胞膜上には糖脂質や糖タンパク質といった複合糖質が多く存在している。複合糖質は、各種の糖が鎖状に連なった糖鎖を持ち、細胞の様々な生理的環境維持に貢献していることが知られている。複合糖質の中でも、糖鎖非還元末端に酸性糖であるシアル酸(Sia)が結合した糖鎖(シアロ糖鎖)を持つものは、細胞間の認識機構や細胞の分化、細菌やウイルスの感染機構といった重要な生命現象に関与している。糖鎖へのシアル酸の付加はシアル酸転移酵素(ST)によって行われる。STには α 2,6-ST、 α 2,3-ST、 α 2,8-STがあり、それぞれ決められた糖鎖末端にシアル酸を α 2,6配位、 α 2,3配位、 α 2,8配位で付加させる。また、STの起源によって受容体基質特異性に差異があることが知られている。これまでの研究で海洋性細菌由来STは動物由来STよりも高い触媒能、幅広い基質特異性を持ち、*In vitro*で多様な構造の糖鎖にシアル酸を付加できることが示されている [1-4]。そのため、本酵素を遺伝子導入により細胞内で発現させることができれば、細胞表面のシアロ糖鎖が増加し、それらが関与する生命現象における新たな知見を得られると期待できる。その知見の一つとして、我々はインフルエンザウイルスに着目した。インフルエンザウイルスのヘマグルチニンがシアル酸を認識することで、感染のプロセスが開始する。そこで本研究では、海洋性細菌由来STを動物細胞内で発現させることでシアロ糖鎖を増加させ、インフルエンザウイルスの感染をより鋭敏に検出する臨床診断システムの開発を目指す。今回、その第一段階として、海洋性細菌由来の α 2,6-STと α 2,3-STを遺伝子導入に

より動物細胞で発現できる系を構築する。動物細胞においてSTの発現と機能を解析し、有用なツールとして確立する。

2. 方法

2.1 目的遺伝子の作製 ST遺伝子は *Photobacterium damsela* 由来の α 2,6-STと *Photobacterium sp.JT-ISH-224* 由来の α 2,3-STを用いた。これらを動物細胞のゴルジ体で発現させるため、動物由来のtransmembrane(TM)領域と海洋性細菌由来STの遺伝子をOver-lap extension PCRによって組み合わせた。その後、QIAEX II[®] Gel Extraction Kit (150) (QIAGEN[®])を用いて精製し、目的遺伝子とした。

2.2 目的遺伝子の塩基配列の解析 作製した目的遺伝子をDual Promoter TA Cloning[®] Kit(Invitrogen)を用いたTAクローニングによってクローニングベクター(pCR[®] II vector)に挿入した。その後、コンピテントセル(TOP10F[®])を用いて形質転換を行い、X-Galを塗布したアンピシリン入りLB寒天培地に播種した。形成した白色のコロニーからQIAGEN[®] Plasmid Midi kit (25) (QIAGEN[®])を用いてプラスミドを抽出し、EcoR Iで制限酵素処理を行ない目的遺伝子が挿入されているものを選択した。選択後、シーケンサー(ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer)を用いて目的遺伝子の塩基配列の解析を行った。

2.3 動物細胞での発現系の構築 正しい塩基配列の目的遺伝子を有するpCR[®] IIをKpn I、Xba Iで制限酵素処理し、目的遺伝子を、QIAEX II[®] Gel Extraction Kit (150) (QIAGEN[®])で精製した。同様に動物発現ベクター

1 : 日大理工・院 (前)・応化 2 : 日大理工・院 (後)・応化 3 : 日大理工・学部・応化 4 : 日大理工・教員・応化

である p3×FLAG-CMV-14 も Kpn I , Xba I で制限酵素処理し, 精製を行なった. その後, 目的遺伝子を p3×FLAG-CMV-14 に Dual Promoter TA Cloning[®]

Kit(Invitrogen)を用いて挿入した.

2.4 タンパク質の発現解析 構築した遺伝子を

TOP10F[®] にヒートショック法を用いて導入し, アンピシリン入り LB 寒天培地に播種した. 形成したコロニーを培養し, タンパク質の抽出を行った. その後, ウェスタンブロット法により ST の発現を確認した. また, 構築した遺伝子を哺乳動物細胞である CHO-K1 に導入した. その後, 大腸菌と同様に ST の発現を確認した.

3. 結果・考察

Over-lap extension PCR によって動物由来の TM 領域と海洋性細菌由来 ST の遺伝子を組み合わせることに成功した. プラスミド抽出で目的遺伝子を有する pCR[®] II が得られた. この目的遺伝子の塩基配列をシークエンサーで解析したところ, 正しい配列である目的遺伝子を有する pCR[®] II を選択できた. 制限酵素処理を行なった目的遺伝子と p3×FLAG-CMV-14 をライゲーション反応させた. その結果, 目的遺伝子を有する p3×FLAG-CMV-14 を得ることができ, 細菌由来 ST を動物細胞で発現できる系を構築できた. 構築した遺伝子を導入した大腸菌と CHO-K1 において ST の発現を確認できた. 本研究では, 海洋性細菌由来の ST が大腸菌において発現できることが示された. この結果から我々が構築した遺伝子が正常に機能できることを証明した. また, CHO-K1 でも同様に ST の発現が確認できたことから動物細胞で ST を発現できる遺伝子を構築できたといえる. 今後はレクチンを用いて細胞表面の Sia 量の増加を確認し, Sia を過剰発現した細胞株として樹立する. その後, インフルエンザウイルスとの結合実験を行い, インフルエンザウイルスの臨床診断システムとしての有用性を示すことを目指す.

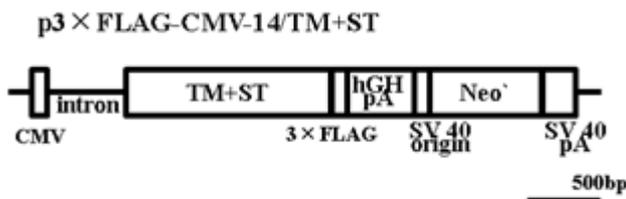


Figure 1. Structure of expression vector for bacterial ST

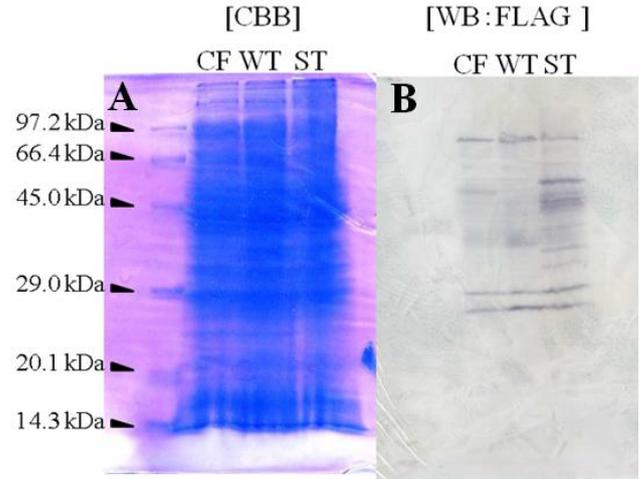


Figure 2. (A)CBB Staining (B)Western blotting

4. 参考文献

- [1] T. Yamamoto, *et al.* : “Bacterial Sialyltransferases”, Trends in Glycosci. & Glycotech., Vol.18, No.102, pp.253-265, 2006.
- [2] Y. Kushi, H. Kamimiya, *et al.* : “Sialyltransferases of marine bacteria efficiently utilize glycosphingolipid substrates”, Glycobiology, Vol.20, No.2, pp.187-198, 2009.
- [3] H. Kamimiya, *et al.* : “Unique gangliosides synthesized in vitro by sialyltransferases from marine bacteria and their characterization; gangliosides synthesis by bacterial sialyltransferases”, The Journal of Lipid Research, submitted.
- [4] H. Tsukamoto, *et al.* : “Photobacterium sp. JT-ISH-224 Produces Two α 2,3-Sialyltransferase and β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase”, J. Biochem., Vol.143, No.2, pp.187-197, 2009.