

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月18日現在

機関番号：36301  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590385  
 研究課題名（和文） トリパノソーマ原虫に発現する複合糖鎖の生合成機構および機能に関する研究  
 研究課題名（英文） Function and biosynthetic machinery of complex *N*-glycans expressing in *Trypanosoma brucei*  
 研究代表者  
 中西 雅之 (NAKANISHI MASAYUKI)  
 松山大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：00281048

### 研究成果の概要（和文）：

アフリカ睡眠病の新しい治療薬開発を目的に、その原因となるトリパノソーマ原虫 (*Trypanosoma brucei*) の遺伝子ノックアウト株を作製し、*N*-結合型複合糖鎖末端の多様性を生じさせる遺伝子を2種類同定した。複合糖鎖は本原虫の生存に不可欠と予想されていたが、作製した遺伝子ノックアウト株はいずれも野生株と等しい増殖速度を示した。従って、複合糖鎖の末端構造の違いは、本原虫の生存にとって重要でないことが明らかになった。

### 研究成果の概要（英文）：

*Trypanosoma brucei*, a causative agent of African sleeping sickness, expresses complex type *N*-linked glycans which are supposed to have critical roles for its growth. We established three strains of gene knock-out mutants and identified two genes that were involved in the synthesis of complex type *N*-linked glycans. Analysis of the strains showed the terminal structures of the glycans were not critical for the normal growth of the parasite.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

### 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：アフリカ睡眠病, 糖転移酵素

#### 1. 研究開始当初の背景

*Trypanosoma brucei* (トリパノソーマ原虫) はヒトや家畜の血流中、または媒介生物となるツエツエバエの中腸で増殖する単細胞真核生物で、ヒトにはアフリカ睡眠病を、家畜にはナガナ病を引き起こす。トリパノソーマ原虫の表面は VSG と呼ばれる糖タンパク質

で密に覆われており、これが高頻度に変化して宿主免疫を回避するため、ワクチン開発は事実上不可能と考えられている。アフリカ睡眠病は致死的な感染症であるため、有効かつ安全な治療薬が必要であるが、特に、トリパノソーマ原虫が中枢に侵入した第2ステージ以降に使用される治療薬（メラルソプロ

ール)は毒性が高いため、安全な新しい治療薬が必要とされている。

トリパノソーマ原虫は、その生活環を通じて複合型糖鎖を発現しており、これらが原虫の生存や宿主免疫の回避に不可欠の機能を果たすと考えられている。従って、複合型糖鎖の生合成経路はアフリカ睡眠病治療薬の標的となる可能性があり、その詳細を明らかにすることは新しい治療薬の開発につながると見込まれる。

タンパク質のアスパラギン残基に結合した複合型糖鎖は、マンノース (Man) 3 残基と *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 2 残基からなるコア構造 (Man3GlcNAc2) に、ガラクトース (Gal) や GlcNAc などの糖が付加した構造を有する。哺乳類では、その生合成に関与する種々の GlcNAc 転移酵素 (GnT) や Gal 転移酵素 (GalT) が同定されており、その生理機能が解明されている。一方で、トリパノソーマ原虫のゲノム上には、それらと相同性を示す遺伝子はほとんど検出されず、UDP-Gal/UDP-GlcNAc 依存性  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3 糖転移酵素 ( $\beta$  3GnT) の相同タンパク質をコードする遺伝子のみが 22 種類検出されるだけである。研究開始当初は、これらのうち Gene ID : Tb927.10.12290 にコードされるタンパク質 (TbGT8) が、ツエツエバエ中の原虫において GPI アンカーを修飾する糖鎖の合成に関与することが明らかになっていたが、その血流中での機能は不明であった。さらに、他の相同遺伝子にコードされるタンパク質の機能については全く分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

トリパノソーマ原虫のゲノムに見いだされる糖転移酵素候補遺伝子 (ヒト  $\beta$  3GalT 遺伝子のオルソログ遺伝子) のうち、8 番染色体上に連続して並んだ遺伝子 (Gene ID : Tb927.8.7140 および 7150) の機能を明らかにする。特に、これら遺伝子が生存に必須の役割を果たすのか、糖鎖のどの構造の構築に必要であるのか、いずれの糖タンパク質が修飾を受けるのかを調べる。そのために、遺伝子ノックアウト株作製、糖鎖解析、プロテオーム解析、*in vitro* 酵素反応解析を実施する。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子ノックアウト株の作製

標的遺伝子がコードするタンパク質は約 400 アミノ酸残基から成り、N,C 両末端領域の配列は異なるものの、中央領域の約 250 アミノ酸残基は配列がほぼ一致する。また、その他の候補遺伝子についても互いの相同性は高いため、RNAi 法での機能解析の結果には曖昧さが残る。従って、相同組換え法を利用して遺伝子ノックアウト株を作製した。ノ

ックアウト株の作製にはトリパノソーマ原虫 single-marker 株 (Wirtz E, et al., Nucl Acids Res 26, 4626) の血流型原虫を用いた。Single-marker 株は、培養系へのテトラサイクリン添加により、エクトピックに導入した T7 プロモーター下流の遺伝子を発現誘導できる株であるため、標的遺伝子を T7 プロモーターの下流に配した遺伝子カセットを作製、導入し、さらに標的遺伝子の両遺伝子座をハイグロマイシンおよびピューロマイシン耐性遺伝子と置換した (トリパノソーマ原虫は二倍体生物であるため)。このようにしてコンディショナルノックアウト (cKO) 株を、それぞれ樹立し、7140cKO 株および 7150cKO 株とした。また、血流型原虫での機能が不明であった TbGT8 についても同様に cKO 株を樹立した (TbGT8cKO 株)。

### (2) 増殖速度解析

樹立した cKO 株および single-marker 株 (以下、野生株) を、テトラサイクリン存在下および非存在下に培養・継代し、計数盤を用いた顕微鏡下での計数により増殖速度を比較した。

### (3) レクチン反応性解析

野生株と cKO 株のライセートを SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜上で種々のレクチンと反応させて糖鎖を検出した。レクチンは糖認識の異なる 9 種類を使用し、遺伝子ノックアウトに起因する変化を調べた。また、アガロース担体に固相化したレクチンを用いて、レクチン結合タンパク質をライセートより回収し cKO 株と野生株とで比較した。さらに、両者で差のあるタンパク質をトリプシンでゲル内消化したのち、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS-MS) で同定した。

### (4) 糖鎖構造解析

BlotGlyco 法を用いて、野生株および cKO 株から *N*-結合型糖鎖を精製し、MALDI-TOF 質量分析を実施した。

### (5) 標的遺伝子産物の細胞内局在

7140 および 7150 遺伝子がコードするタンパク質および TbGT8 の C 末端に HA タグを融合したタンパク質を、トリパノソーマ原虫で過剰発現させ、間接蛍光抗体法で HA タグ融合タンパク質の細胞内局在を調べた。また、小胞体およびゴルジ体のマーカータンパク質として、トリパノソーマ原虫由来 BiP

(GeneID: Tb927.11.7460) および GRASP (GeneID: Tb927.11.2660) を選択し、ペプチド抗体を作製した。観察には共焦点レーザー顕微鏡を使用した。

### (6) 組換えタンパク質の産生と糖転移活性の測定

標的遺伝子にコードされるタンパク質を、大腸菌発現系およびコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて発現させた。目的タン

パク質はII型膜タンパク質と予測されるため、大腸菌発現系では、細胞膜貫通領域を除く触媒ドメインのみをマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として産生し、アミロスカラムおよびゲル濾過カラムを利用して精製を試みた。また、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系では、リポソームの存在下および非存在下に、N末端にHisタグを付したタンパク質を発現させた。

組換えタンパク質について、*in vitro*での酵素活性を測定した。糖供与体にはUDP-GalおよびUDP-GlcNAcを使用した。糖鎖受容体については、市販の蛍光誘導体化糖鎖（ピリジルアミノ化糖鎖）、アシアロフェツインおよびオボムコイドから精製・蛍光誘導体化した糖鎖、野生株およびcKO株のトリパノソーマ原虫から精製・蛍光誘導体化した糖鎖を使用し、糖鎖構造の変化を高速液体クロマトグラフィーで分離・検出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝子ノックアウト株の作製

多重遺伝子であるリボソームRNA遺伝子の一つの遺伝子座に、T7プロモーターおよびテトラサイクリンオペレーターの下流に7140遺伝子を配した遺伝子カセットを導入したのち、本来の遺伝子座に存在する7140遺伝子の一方をハイグロマイシン耐性遺伝子、他方をピューロマイシン耐性遺伝子で置換することができた。遺伝子置換はサザンブロットで、テトラサイクリン添加による遺伝子発現誘導はRT-qPCRで分析し、取得株がcKO株であることを確認した。

7150遺伝子およびTbGT8遺伝子についても、同様にcKO株を樹立することができた。

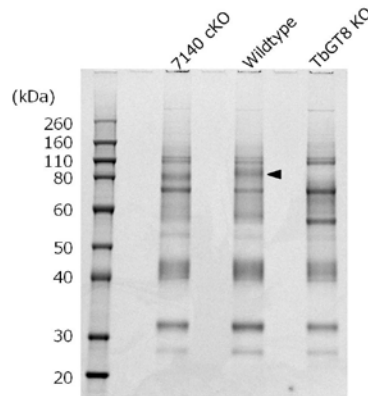
##### (2) 増殖速度解析

これらcKO株は、テトラサイクリン存在下・非存在下に同じ増殖速度を示した。また、野生株の増殖速度とも差異は認められなかったことより、少なくとも培養条件下では本遺伝子が原虫の増殖に影響を与えないことが明らかとなった。

##### (3) レクチン反応性解析

レクチンブロットの結果、7140cKO株では、トマトレクチンと反応する糖タンパク質に分子量が低下するものがあることが明らかになった。トマトレクチンは糖鎖末端のN-アセチルラクトサミン構造を認識・結合するレクチンである。一方、7150cKO株では種々のレクチンに対する反応性に変化は認められなかった。このことは、7150遺伝子にコードされるタンパク質は、糖タンパク質以外の糖鎖の生合成に関与することを示唆している。また、TbGT8cKO株については、すでに報告されている通り、トマトレクチンとの反応性が顕著に低下することが確認された。

7140cKO株およびTbGT8cKO株のレクチンブロット解析で、差異が認められたバンドに含まれるタンパク質を同定する目的で、トリパノソーマ原虫ライセートに対して、固相化レクチンによるプルダウン実験を行い、結合タンパク質をキチン水解物で溶出した。これらをSDS-PAGE後、クマシーブルー染色し、野生株では存在するもののcKO株では消失しているバンドを特定した（下図矢印）。



このバンドを切り出し、ゲル内消化後、LC-MS-MS分析によるタンパク質同定に供した。その結果、このバンドには、酸性ホスファターゼ (TbAcP)、p67リソソーム/エンドソームタンパク質、expression-site associated gene 2タンパク質、83 kDa熱ショックタンパク質、セリンカルボキシペプチダーゼなどが含まれていることが明らかになった。

このうち、GeneID: Tb927.5.630にコードされるTbAcPに着目し、TbGT8null株で過剰発現させたところ、野生株で過剰発現させた場合と比較して小さい分子量を示したことより、TbAcPはTbGT8によって糖鎖修飾を受けるタンパク質の一つであることが明らかになった。

##### (4) 糖鎖構造解析

野生株および3種類のcKO株が発現するN結合型糖鎖を、原虫ライセートからBlotGlyco法で精製し、MALDI-TOFMSで解析したところ、野生株で検出される糖鎖Hex3HexNAc2 + Man3GlcNAc2およびHex4HexNAc2 + Man3GlcNAc2が、7140cKO株においては発現していないことが明らかになった (Hexはヘキソース、HexNAcはN-アセチルヘキソサミン)。これまでにトリパノソーマ原虫で報告されている糖鎖の構造に照らせば、前者はGal3GlcNAc2 + Man3GlcNAc2、後者はGal4GlcNAc2 + Man3GlcNAc2と推定される。すなわち、7140遺伝子にコードされるタンパク質は、Gal2GlcNAc2 + Man3GlcNAc2のGal末端にGalを転移する酵素活性を持つことが示唆された。

一方、7150cKO株が発現するN結合型糖

鎖のマススペクトログラムは、野生株のそれと一致した。この結果は、7150 遺伝子にコードされるタンパク質が、糖タンパク質の N-結合型糖鎖修飾には関与しないことを示しており、レクチンブロット解析の結果を支持するものである。

また、TbGT8cKO 株においては、野生株に比較して Hex3HexNAc3 + Man3GlcNAc2 の顕著な増加および Hex4HexNAc4 + Man3GlcNAc2 の減少が認められた。TbGT8 は、ツエツエバエ中腸のステージで GPI アンカーを修飾する GlcNAc 転移酵素活性を持つことから、血流型では N-結合型糖鎖の Gal3GlcNAc3 + Man3GlcNAc2 の Gal 末端に GlcNAc を転移する酵素活性を持つことが示唆された。

#### (5) 標的遺伝子産物の細胞内局在

標的遺伝子がコードするタンパク質の細胞内局在を明らかにするために、それぞれの C 末端に HA タグを付したタンパク質を過剰発現する株を樹立した。また、小胞体およびゴルジ体を染色するペプチド抗体（それぞれ抗 BiP 抗体および抗 GRASP 抗体）を作製した。抗 BiP 抗体は、ウェスタンブロットにおいて高い特異性を示し、間接蛍光抗体法 (IFA) でも良好な染色像を得ることができたが、抗 GRASP 抗体は特異性が低く、IFA においてもトリパノソーマ原虫特有のゴルジ体像、すなわち DAPI で染色される核とキネトプラストの間に位置する 1 つのドット状のシグナル、を得ることはできなかった。

過剰発現した HA タグ標識タンパク質は、BiP とは共局在せず、DAPI で染色される核とキネトプラストの間に 1 つのドット状に存在した。このことは、標的遺伝子産物がゴルジ体に局在することを示唆するが、特異性の高い別の抗 GRASP 抗体を用いて確認する必要がある。

#### (6) 組換えタンパク質の産生と糖転移活性の測定

標的遺伝子を大腸菌で発現させたところ、組換えタンパク質はいずれの条件でも封入体を形成し、可溶性酵素を得ることはできなかった。コムギ無細胞タンパク質合成系では、レシチンで調製したリポソームの共存下、非共存下に標的遺伝子を翻訳し、糖転移酵素活性を測定した。この場合も、タンパク質の合成は確認されたが、糖転移活性は検出されなかった。この原因として、酵素活性の発現には、糖転移酵素自身が糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受ける必要がある、別のタンパク質とヘテロオリゴマーを形成する必要がある、などの可能性が考えられた。

以上、本研究で標的とした遺伝子は、アフリカ睡眠病の治療薬開発の標的とはならないが、7140 遺伝子および TbGT8 遺伝子は、

N-結合型複合糖鎖のバリエーション形成に関与していることが明らかとなった。トリパノソーマ原虫において N-結合型複合糖鎖の合成に関与する遺伝子の同定は、本研究が初めてであり、今後、この成果を端緒に本原虫での糖鎖合成経路の解明が進むと期待される。

#### 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)

[学会発表] (計 5 件)

① 中西 雅之、白石 喬寛、野元 裕、β3 糖転移酵素ファミリーに属するアフリカトリパノソーマ原虫酵素の機能解析、第 10 回分子寄生虫・マラリアフォーラム、平成 24 年 10 月 13 日、群馬

② 中西 雅之、野元 裕、アフリカトリパノソーマ原虫において N-結合型複合糖鎖の合成に関与する糖転移酵素、第 84 回日本生化学会大会、平成 23 年 9 月 22 日、京都

③ Masayuki Nakanishi, Hiroshi Nomoto, Deletion of a putative glycosyltransferase gene from chromosome 8 in *Trypanosoma brucei* reduces the size of N-glycans, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 平成 23 年 9 月 9 日、札幌

④ 中西 雅之、井上 弥希、好井 啓輔、野元 裕、Deletion of a glycosyltransferase gene, TbGT8, in *Trypanosoma brucei* affects the size of a 57 kDa protein in the mammalian stage, 第 83 回日本生化学会大会、平成 22 年 12 月 10 日、神戸

⑤ Masayuki Nakanishi, Hiroaki Arioka, Miki Inoue, Hiroshi Nomoto, Disruption and characterisation of glycosyltransferases encoded by genes on chromosome 8 of *Trypanosoma brucei*, The XIIth International Congress of Parasitology 2010, 平成 22 年 8 月 18 日、オーストラリア

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中西 雅之 (NAKANISHI MASAYUKI)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：00281048