

## 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 10 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2011～2013

課題番号：22590407

研究課題名（和文）真菌βグルカンの簡易検出法の作製

研究課題名（英文）Examination of rapid and easy detection methods for fungal beta-glucans

研究代表者

安達禎之（ADACHI YOSHIYUKI）

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60222634

研究成果の概要（和文）：深在性真菌症の補助診断として用いられているβ-グルカン検出法の改良を目指して、無脊椎動物由来のβ-グルカン認識タンパク（BGRP）及びC型レクチンのdectin-1のβ-グルカン結合活性を検討し、β-グルカン構造特異性及び検出感度などの観点から真菌β-グルカンの検出に適したBGRP類を選抜した。更に、BGRPの発現法の検討、ELISA法やイムノクロマト法での検出感度向上を目指した。実験動物モデルにおいて、血中β-グルカンの検出を試み、微量β-グルカンが検出可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：To develop a specific detection methods for fungal products, particularly beta-glucans found in blood of mycosis patient, we examined various beta-glucan recognition proteins (BGRP) from invertebrates and mammalian. The binding specificities of the recombinant BGRPs to the beta-glucans from various natural source, including fungi, bacterium, algae, and plants were compared to choose suitable protein probes for the detection. The combination of selected BGRPs was applied for ELISA methods and immunochromatography. Using those devices, we could detect trace level of beta-glucans in the blood from animal model of fungal infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,400,000	420,000	1,820,000
23年度	800,000	240,000	1,040,000
24年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：β-グルカン、深在性真菌症、β-グルカン認識タンパク、ELISA、イムノクロマトグラフィー

## 1. 研究開始当初の背景

臓器移植、抗悪性腫瘍治療による延命など高度医療の進歩に伴い、真菌感染症は増加の一途を辿っている。重篤な感染症となりうる深在性真菌症は、原因菌の同定が比較的困難であり、患者血中に遊離した真菌成分の免疫

学的・生化学的診断が主となっている。また、その早期診断の成否は抗菌剤の適正使用・治療効果を高めるために重要である。β-グルカン（BG）は真菌細胞壁に普遍的に存在することから、ユニバーサルに真菌感染を診断するのに有効な標的分子の一つである。しかし、

一方では、感染とは無関係に BG が検出されてしまう偽陽性も問題となっている。この問題には診断薬を構成する(1→3)-β-D-グルカン認識タンパク質 (BGRP) の反応特異性が関わっている。即ち、現診断薬に含まれるカプトガニ由来 BGRP は、真菌のみならず植物細胞壁に含まれる(1→3)-(1→4)-β-D-グルカンにも反応性を有しているため、医療器材 (透析膜、脱脂綿) 由来の BG や生活環境 (綿製布など) から発生した大気中 BG の判別を不可能にしている。これは実際の測定操作をクリーン環境で行わなければならないなど、操作の煩雑性の原因にもなっている。これらの課題に対し、申請者らは、様々な陸上無脊椎動物種より 4 種類の BGRP をクローニング、組換え型タンパク質の発現・分取を行うことにした。また、哺乳動物種において真菌細胞壁の BG を認識する C 型レクチン様受容体 dectin-1 の糖鎖認識ドメイン (CRD) についても可溶性タンパクとして発現させ、多糖反応特異性を検討し CRD の反応性の特異性を応用することで、真菌の免疫学的簡易判定がより精度良く行えるか検討した。

## 2. 研究の目的

病原性真菌多糖の血液診断キット (イムノクロマトグラフィ) の具現化に向けて、各 BGRP の BG 構造特異性と BGRP タンパク発現効率の観点から、最適な BGRP 分子、BG 受容体分子、BG 抗体の組合せを ELISA 法により選定する。イムノクロマトグラフィを試作する。血液検体の前処理法の検討、検出安定性等を評価する目的で、プロトタイプを作製する。そして、真菌感染モデル動物血液等の検体中の BG 検出を行い、実用性を検討する。以上の検討を通じて新たな真菌 β-グルカンの検出法を提案する。

## 3. 研究の方法

### (1) β-グルカン認識タンパクの分子クローニング

カイコ *Bombyx mori* (Kinsho) (Bm), ミールワーム *Tenebrio molita* (Tm) は市販品を利用した。ノシメマダラメイガ *Plodia interpunctera* (Pi), コクヌストモドキ *Triborium castaneum* (Tc)、カシミールコクヌストモドキ *Triborium freemani* は (独) 食品総合研究所、宮ノ下明大博士から供与された。モンシロチョウ *Pieris rapae*、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* は採取して用いた。各幼虫のホモジネートから RNA を抽出し、M-MLV 逆転写酵素により cDNA を作成した。cDNA は PCR primer を用いて増幅し、ヒト IgG1Fc の cDNA と結合したものを pDisplay vector に挿入し、293T 細胞に lipofection 後、培養上清より Fc 融合タンパク質を回収した。ELISA により、濃度を求め、

一定量を BG の結合アッセイに用いた。

### (2) 組換え型 BGRP の大量分取の検討

BGRP の大量発現を行う目的で、大腸菌を用いた pCold 発現系で行った。各種 BGRP 及び dectin-1 の CRD の cDNA を導入した大腸菌 B21 を培養後、コールドショック発現条件でタンパクを発現誘導し、溶菌液より Co<sup>2+</sup>金属カラムを用いて His-tag タンパクとして BGRP を回収・精製した。得られた精製タンパクは、更にビオチン標識し、ELISA の検出用タンパクとして使用した

### (3) 各種 β-グルカンに対する BGRP 結合性の検討

#### ① 固相化 β-グルカンに対する反応性の検討

各種 β-グルカン を 96 well nunc ELISA plate に 50 μl/well 入れ、4°C、over night インキュベートし固相化した。0.05% Tween20 in PBS (PBST) で wash 後、5% BSA/PBS (BPBS) 100 μl/well を入れて室温で 2h blocking した。2h 後、PBST で wash し、BGRP-Fc (BPBS にて 0~100ng/ml に希釈) を 50 μl/well を加え、室温で 1h 放置。1h 後、PBST で wash し、HRP 標識抗 human IgG Fc antibody (0.2mg/ml) を 50 μl/well 入れ室温で 1h 放置。1h 後、PBST で wash し、基質 TMB を 50 μl/well 入れ、5min 後 1M phosphoric acid 50 μl/well で反応を停止し、OD450/630 の吸光度を測定した。

#### ② 競合拮抗反応による BGRP 結合活性評価

Candida β-グルカン (CSBG) を 96 well nunc ELISA plate に 50 μl/well 入れ、4°C、over night インキュベートし固相化した。BGRP-Fc と各種 β-グルカン溶液 (0.01~100ng/ml) とを室温で 1h インキュベートした後、ELISA プレートに添加し、1h 後、PBST で 7 回洗浄して、TMB を 50 μl/well 入れ、1M phosphoric acid 50 μl/well で反応を停止し、OD450/630 の吸光度を測定した後、IC<sub>50</sub> を求めた。

#### (4) BGRP によるサンドイッチ ELISA 法システムの作製

Bm-BGRP または Tc-BGRP (1 μg/ml) を 96 well nunc ELISA plate に 50 μl/well 入れ、4°C、over night インキュベートし固相化した。β-グルカン (0.6 ng/ml-10 μg/ml) を plate に添加し、Bm-BGRP-biotin 標識体 (1 μg/ml) 及びストレプトアビジン-HRP を 50 μl/well 入れ室温で 1h 放置。1h 後、PBST で wash し、基質 TMB を 50 μl/well 入れ、5min 後 1M phosphoric acid 50 μl/well で反応を停止し、OD450/630 の吸光度を測定した。

#### (5) BGRP を用いたイムノクロマトグラフィ (IC) の構築

##### ① カラムフロー型 IC の作製

Tc-BGRP を AF-Amino-650M ゲルに固定化し、ディスプレイプラスティックカラムに充填

し、BSA を含む PBS でブロッキングし IC カラムとした。カンジダ  $\beta$ -グルカン (0-10  $\mu$ g/ml) を含む検体試料 50  $\mu$ l をカラムに流し、Bm-BGRP-biotin 標識体 (100ng/ml) 及びストレプトアビジン-HRP 混液 50  $\mu$ l をカラムに添加後、洗浄液 3ml を 3 回通過させ基質 TMB エンハンサー混合液を 50  $\mu$ l カラムに添加し、発色を観察した。

#### ②メンブランフロー型 IC の作製

Bm-BGRP、Pi-BGRP、Tc-BGRP (1mg/ml、2  $\mu$ l) を PVDF メンブランに固定化、ブロッキングし BGRP メンブランとした。 $\beta$ -グルカン試料を通過させ、Bm-BGRP-biotin 標識体 (100ng/ml) 及びストレプトアビジン-HRP 混液 50  $\mu$ l を通過させ、基質 TMB エンハンサー混合液を添加し発色を観察した。

#### (6) 血中 $\beta$ -グルカンの検出

C57BL/6 野生型マウス、dectin-1<sup>-/-</sup>マウス、及び CD11b<sup>-/-</sup>マウスに真菌  $\beta$ -グルカンを投与後、経時的に部分採血し、BGRP によるサンドイッチ ELISA 法に従い、血中の  $\beta$ -グルカンを測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) $\beta$ -グルカン認識タンパクの分子クローニング

BGRP 及び dectin-1CRD の Fc 融合型遺伝子を作成し、293T 細胞への遺伝子導入によりタンパク分子を発現させた。培養から得られたタンパク量及び *Candida*  $\beta$ -グルカン及び (1 $\rightarrow$ 6)-分岐型 (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンへの結合活性及び特異性から *Bombyx mori* (Bm), *Plodia interpunctella* (Pi), *Tribolium castaneum* (Tc) の BGRP 及び Mouse dectin-1 を特徴的な BGRP として選抜した (Table1)。

Table 1 BGRP-Fc 融合タンパク分子発現と BG 結合能

生物種	遺伝子名	タンパク発現	Candida (BG) 結合能	Branched BG 結合能
<i>Homo sapiens</i> (Human)	Dectin-1	+	++	+
<i>Mus musculus</i> (Mouse)	Dectin-1	++	++	++
<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)	Dectin-1	++	++	++
<i>Bombyx mori</i> (Silkworm)	BGRP	++	++	++
<i>Pieris rapae</i> (Cabbage White)	BGRP1 BGRP3	+ +	++ -	++ -
<i>Plodia interpunctella</i> (Indian meal moth)	BGRP1	++	++	++
<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruit fly)	GNBP3	+	+	+
<i>Tenebrio molitor</i> (Yellow mealworm)	BGBP	++	++	-
<i>Tribolium castaneum</i> (Red flour beetle)	BGRP1 BGRP2	+ +	+ -	- -
<i>Tribolium freemani</i> (Cashmir flour beetle)	BGRP1	+	+	-

#### (2) 組換え型 BGRP の大量分取の検討

ELISA やイムノクロマトグラフィーに用いる BGRP を大量に分取する目的で、大腸菌のコールドショック発現システムを用いた。Dectin-1 の CRD を大腸菌で発現させたところ、

封入体形成を引き起こし不溶化した。そこで塩酸グアニジン、DTT による変性と高濃度アルギニン溶液中でのリフォールディングを行い、水溶性タンパクを回収することが出来た。

一方、Bm、Pi、Tc-BGRP は変性とリフォールディングを必要とせず、水溶性タンパクとして回収できた。大腸菌 400ml の培養から、BGRP は約 1mg、dectin-1CRD は 0.4mg の可溶性タンパクを単離した。精製効率や分取工程の簡便さを鑑み、BGRP を中心に用いて  $\beta$ -グルカン検出システムに応用することにした。

#### (3) 各種 $\beta$ -グルカンに対する BGRP 結合性の検討

##### ①固相化 $\beta$ -グルカンに対する反応性の検討

BGRP の  $\beta$ -グルカン反応特異性を検討する目的で、真菌、藻類、植物、細菌由来の各種グルカンを ELISA プレートに固相化し、BGRP-Fc タンパクの結合性を比較したところ、Fig. 1 に示したように、Bm-や Pi-BGRP は真菌の (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンに幅広く高い反応性を示し、藻類 *L. digitata*, *E. araborea*, *E. bicyclis*、地衣類 Pustulan などの  $\beta$ -グルカンには中程度、植物の Barley glucan や  $\alpha$ グルカンの dextran にはほとんど結合しないことが示された。また、Tc-BGRP は Tm-BGRP と同様にカンジダ  $\beta$ -グルカン CSBG や酵母  $\beta$ -グルカンには高い反応性を示したが他の真菌  $\beta$ -グルカンや藻類、植物の  $\beta$ -グルカンにもほとんど結合しないことが示された。

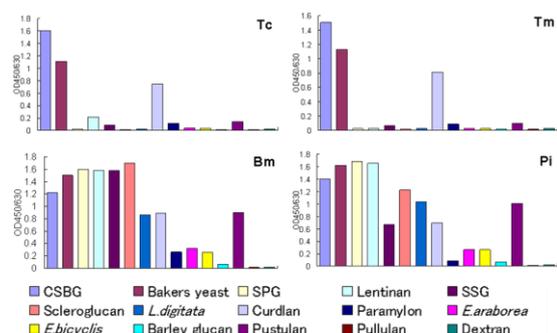


Fig.1 固相化した各種  $\beta$ -グルカンへの BGRP 結合活性 (ELISA)

##### ②競合拮抗反応による BGRP 結合活性評価

固相化したカンジダ  $\beta$ -グルカン CSBG に対する各種 BGRP の結合阻害活性 (IC<sub>50</sub>) により、様々な  $\beta$ -グルカンの反応特異性を評価した。先の固相化グルカンに対する結合性と同様に Bm-BGRP は真菌  $\beta$ -グルカンへの広い反応性が明らかとなり、Tc-BGRP はカンジダ  $\beta$ -グルカンへの反応性に優れていることが明らかとなった (Fig. 2)。

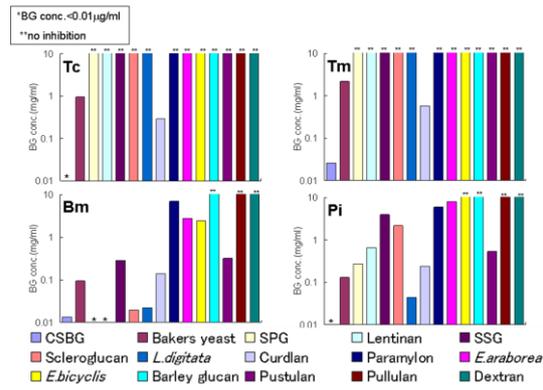


Fig. 2 CSBG-BGRP 結合における各種 BG の結合阻害作用 (IC50)

#### (4) BGRP によるサンドイッチ ELISA 法システムの構築

大腸菌発現により得られた Bm-BGRP 及び Tc-BGRP を用い、 $\beta$ -グルカン検出用 ELISA 法の作製を行った。カンジダ  $\beta$ -グルカンに対する反応曲線は Bm-BmBGRP または Tc-BmBGRP の組合せでも差は無く、検出感度は 2.4ng/ml であった。また、(1 $\rightarrow$ 6)-分岐型(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンである真菌  $\beta$ -グルカン (SPG) に対しては Tc-BmBGRP の組合せで検出感度が 625ng/ml と著しく反応性が低下することが明らかとなった。またこの反応性差は  $\beta$ -グルカンの構造推定にも応用できる可能性を示唆した。

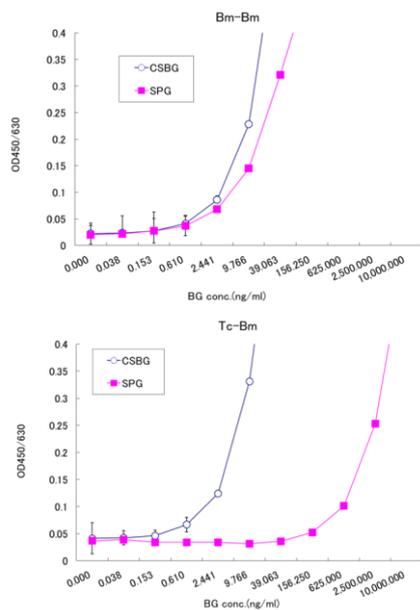


Fig. 3 BGRP サンドイッチ ELISA による  $\beta$ -グルカン検出感度の検討

上段 Capture : Bm, Detection : Bm-bio  
下段 Capture : Tc, Detection : Tc-bio

#### (5) BGRP を用いたイムノクロマトグラフィー (IC) の作製

##### ①カラムフロー型 IC の作製

BGRP をビーズ担体に固定し、 $\beta$ -グルカンを含む試料を透過させ吸着した  $\beta$ -グルカンを標識 BGRP で測定するカラムフロー型イムノクロマトグラフィーを作製し、 $\beta$ -グルカンの検出を試みた。その結果、10ng のカンジダ  $\beta$ -グルカンに対しては、陽性を示す発色が認められたが、5ng では僅かであり判定が難しいことが示された (Fig. 4 左)。

##### ②メンブランフロー型 IC の作製

メンブランフィルターに BGRP を固定し、 $\beta$ -グルカンを含む試料を通過させ吸着した  $\beta$ -グルカンを標識 BGRP で反応させることで  $\beta$ -グルカンを検出することにした。その結果、Bm-BGRP や Pi-BGRP では 100  $\mu$ g/ml の真菌  $\beta$ -グルカンを検出することが出来た (Fig. 4 右)。また、Tc-BGRP では全くシグナルが認められず、ELISA で観察された反応特異性と同様な結果が得られた。

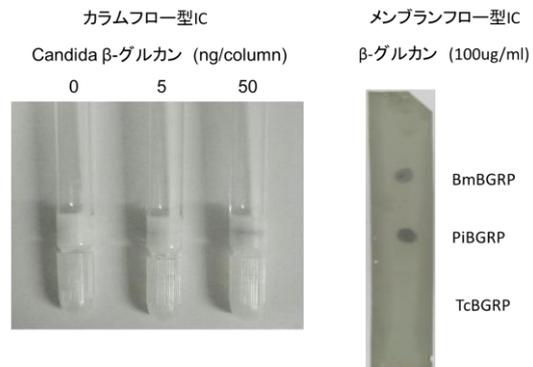


Fig. 4 イムノクロマトグラフィー (IC) による BG の検出

#### (6) 血中 $\beta$ -グルカンの検出

真菌感染を想定し、 $\beta$ -グルカンを投与したマウスの末梢血を経時的に採取し、血液中の  $\beta$ -グルカンが検出・定量可能か BGRP の ELISA を用いて検討した。野生型マウス (WT)、 $\beta$ -グルカン受容体 (dectin-1 $^{-/-}$ 、CD11b $^{-/-}$ ) のノックアウトマウスの末梢血中の  $\beta$ -グルカンを Bm-BmBGRP の組合せのサンドイッチ ELISA 法で測定した。その結果、野生型マウス及び CD11b $^{-/-}$  マウスでは同様の血中  $\beta$ -グルカン値を  $\mu$ g/ml オーダーで示したが、dectin-1 $^{-/-}$  KO マウスでは著しく低い値が観察された (Fig. 5)。

真菌感染患者の血中  $\beta$ -グルカン cut-off 値は 20pg/ml と報告されている。しかし、BGRP を用いた本 ELISA 法では検出限界が 2.4ng/ml であった。また  $\beta$ -グルカンを投与したマウ

スの血液の中から検出できたβ-グルカン濃度も同程度が下限であった。

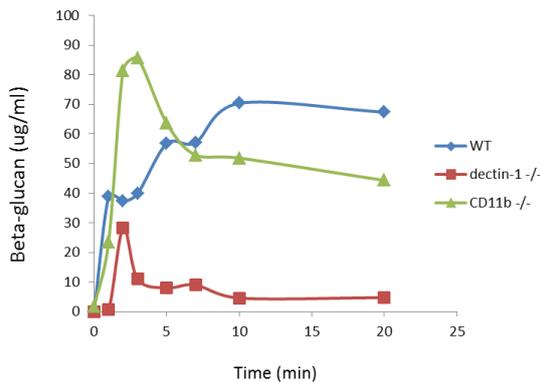


Fig. 5 β-グルカンを投与したマウスの血中濃度測定

#### (7) まとめ

本研究では、真菌β-グルカンに特異的に結合するBGRPを見出し、その大量発現系、ELISA法やIC法による検出システムを構築することができた。しかし、検出感度の面からは改良の余地が残されていることも明らかとなった。

実際の深在性真菌患者血中のβ-グルカンが本ELISA法やIC法で検出可能かは今後の検討課題である。

#### 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7件)

①安達禎之、真菌PAMPsβ-グルカンの構造多様性と自然免疫活性化作用、第23回ケミカルバイオロジー領域勉強会、2010/7/21、理化学研究所(埼玉県)

② Masaki Ishii, Yoshiyuki Adachi, Ken-ichi Ishibashi, Noriko Miura, Akihiro Miyanoshita, Taro Imamura, Hiroshi Tamura, Naohito Ohno, Innate immune receptors from invertebrate distinguish fine structural difference of beta-glucans、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010/12/7、神戸ポートアイランド(兵庫県)

③安達禎之、大野尚仁、β-グルカンの免疫認識における多様性、β-1,3グルカンとdectin-1の化学生物医学の基礎と応用に関する研究会、2011/10/16、北九州市立大学サテライトキャンパス(福岡県)

④ Yoshiyuki Adachi, Masaki Ishii, Ken-ichi Ishibashi, Noriko Miura, Mayumi Kanagawa, Yoshiki Yamaguchi, Akihiro Miyanoshita, Taro Imamura, Naohito Ohno,

Binding specificity of beta-glucan recognition proteins to triple-helical beta-glucans、第34回日本分子生物学会年会、2011/12/14、パシフィコ横浜(神奈川県)

⑤安達禎之、免疫賦活性真菌多糖β-グルカンの構造と免疫認識機構、第6回多糖の未来フォーラム、2012/11/2、慶應義塾大学理工学部(神奈川県)

⑥安達禎之、石橋健一、三浦典子、大野尚仁、自然免疫系β-グルカン結合タンパクのグルカン構造特異性、第56回日本医真菌学会総会・学術集会、2012/11/10、京王プラザホテル多摩(東京都)

⑦ Y. Adachi, K. Ishibashi, N. Miura, and N. Ohno, Cell-based reporter assay using innate/acquired immune receptors for detecting fungal products、第86回日本細菌学会総会、2013/3/18、幕張メッセ(千葉県)

[図書] (計1件)

安達禎之、シーエムシー出版、「β-グルカンの基礎と応用」第2章 β-グルカン結合タンパク質、2010、283、(13-23)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/menekigaku/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安達 禎之 (ADACHI YOSHIYUKI)

東京薬科大学

研究者番号: 60222634

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

大野 尚仁 (OHNO NAOHITO)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 80152213

三浦 典子 (MIURA NORIKO)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 30218036

石橋 健一 (ISHIBASHI KEN-ICHI)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 20453805