

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18506

研究課題名(和文)生物種間相互作用におけるガレクチン-GalFucユニット間相互作用の役割

研究課題名(英文)Biological role of galectin-GalFuc glycoepitope interaction in species-species interaction

研究代表者

武内 智春 (Takeuchi, Tomoharu)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：90439563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：寄生性線虫の感染者は全世界で10億人超であり深刻な問題となっています。本研究では、ガレクチン-2と(寄生性)線虫の相互作用について主に線虫*C. elegans*をモデルに調べました。その結果、ガレクチン-2は線虫特異的なGalFucエピトープを含む糖鎖と相互作用し、線虫に対し抑制的に作用すること、また、様々な寄生性線虫にもGalFucが存在することを明らかにしました。以上の結果から、ガレクチン-2は、GalFucエピトープとの相互作用を介して、様々な寄生性線虫に対して抑制的に働く可能性が示唆されました。

研究成果の概要(英文)：Parasitic nematodes infection affects more than 1 billion people worldwide and remains as a serious health problem in the world. In this study, the effect of galectin-2 on (parasitic) nematodes was investigated mainly using a free-living nematode *C. elegans* as a model. It was found that galectin-2 interacts with a nematode specific GalFuc glyco-epitope and suppresses the growth of *C. elegans*, and furthermore, the existence of the GalFuc epitope in various parasitic nematodes. These results suggest the possibility that galectin-2 suppresses various parasitic nematodes infection through interaction with the GalFuc epitope.

研究分野：糖鎖生物学、生化学

キーワード：ガレクチン 糖鎖 線虫 寄生虫 Galactose 1-4Fucose 種間相互作用

1. 研究開始当初の背景

カイチュウなどの寄生性線虫の感染は、発育障害、貧血、栄養失調などを引き起こします。現在、先進国における感染者は比較的少ないものの、全世界における感染者は約 10 億人超であり、医療上の大問題となっています。しかし、いまだ有効なワクチンなどは開発されていません。この理由として、宿主による寄生性線虫感染応答のメカニズムについて未解明な点が多いこと、特に、糖鎖生物学の見地からの研究が進んでいないこと、が考えられています。

ガレクチンは動物界全般において保存されたレクチンで、その糖結合ドメインにおいて保存された 8 つのアミノ酸残基を介して、Gal 1-4GlcNAc などの β -ガラクトシド構造を含む糖鎖に結合します。ヒトやマウスのガレクチンは内在性糖鎖を認識することで、発生、分化、がんなどに関与します。また、近年、ガレクチンは、異種生物の糖鎖も認識し、生体防御因子として働くことが徐々に明らかされています。ガレクチンと結合しうる異種生物の糖鎖エピトープ候補の一つである、Galactose β 1-4Fucose (GalFuc) 糖鎖エピトープは、前口動物である、イカ、タコ、カサガイ、プラナリア、自由生活性線虫 *C. elegans*、寄生性線虫 *O. dentatum* および *A. suum* の N 結合型糖鎖においてのみ発見されているユニークな二糖ユニットです。

研究代表者は、これまでにヒトやマウスの主要なガレクチンが(化学合成した)GalFuc 糖鎖エピトープに結合することを明らかにし、ガレクチンが GalFuc 糖鎖エピトープとの結合を介して寄生性線虫などに対する生体防御因子として働く可能性を提示しています。

2. 研究の目的

本研究では、寄生性線虫のモデルとして主に線虫 *C. elegans* を用い、ガレクチンが線虫に与える影響の詳細を明らかにし、それにより、GalFuc 糖鎖エピトープを介したガレクチン(寄生性)線虫間相互作用の知的基盤を確立することを目的としています。

3. 研究の方法

(1)ガレクチン-2 と線虫 *C. elegans* 内在性糖鎖との相互作用の解析
野生型や変異型のリコンビナントガレクチン-2 と、線虫内在性糖鎖、糖タンパク質との相互作用を、フロンタルアフィニティークロマトグラフィーやアフィニティークロマトグラフィーなどにより調べました。

(2)ガレクチン-2 が線虫 *C. elegans* に与える影響の解析

リコンビナントマウスガレクチン-2 タンパク質などが線虫の成長に対し抑制的に作用

するか、リコンビナントタンパク質を線虫の液体培養系に添加することで調べました。なお、リコンビナントタンパク質は、大腸菌 BL21(DE3)株などを用いて発現させたのち、GalFuc 固定化カラムを用いて、アフィニティー精製しました。

(3)寄生性線虫における GalFuc 糖鎖エピトープの存在の検証

寄生性線虫における GalFuc 糖鎖エピトープの存在について、抗 GalFuc 抗体などを用いて調べました。また、ガレクチン-2 が寄生性線虫の糖タンパク質に結合する可能性についても検証しました。

4. 研究成果

(1)ガレクチン-2 と線虫 *C. elegans* 内在性糖鎖との相互作用の解析

線虫内在性糖鎖を用いたフロンタルアフィニティークロマトグラフィーにより、ガレクチン-2 が線虫糖鎖の GalFuc エピトープに結合することを明らかにしました。また、線虫ガレクチンの GalFuc エピトープとの相互作用の構造解析結果を参考に、GalFuc エピトープへの結合力を低下させたガレクチン-2 変異体を作成し、その結合メカニズムの一端を明らかにしました。

続いて、リコンビナントマウスガレクチン-2 タンパク質固定化カラムを作成し、ガレクチン-2 と結合する糖タンパク質を精製しました。精製したガレクチン-2 結合性タンパク質について抗 GalFuc エピトープ抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い、ガレクチン-2 が糖タンパク質上の GalFuc エピトープとも相互作用することを示しました。なお、精製した糖タンパク質について質量分析計を用いた解析も行い、ガレクチン-2 結合性タンパク質を同定しました。

さらに、蛍光標識したリコンビナントマウスガレクチン-2 タンパク質を調製し、それを用いて生きた線虫を染色し、線虫の腸管が特異的に染色されること、その結合はラクトースにより阻害されること、すなわち、 β -ガラクトシド依存的な結合であること、を示しました。

(2)ガレクチン-2 が線虫 *C. elegans* に与える影響の解析

L1 期の線虫 *C. elegans* を調製し、それを液体培地中で、餌となる大腸菌 OP50-WT およびリコンビナントガレクチンタンパク質とともに飼育し、数日後線虫の生育状態について確認しました。この実験系において、リコンビナントマウスガレクチン-2 タンパク質が線虫の成長に抑制的に働くことを明らかにしました。また、他のリコンビナントタンパク質についても同様に調べ、ヒトガレクチン-2 も同様の活性を持つこと、一方で、GalFuc エピトープに結合しないマウスガレ

クチン-2 変異体や、他の主要なガレクチンであるガレクチン-1、ガレクチン-3 は、線虫の成長に特に影響しないことを示しました。さらに、GalFuc エピトープに結合する線虫の内在性ガレクチン LEC-6 のリコンビナントタンパク質も調製し、LEC-6 の添加は線虫の成長に特に影響しないことを示しました。

(3) 寄生性線虫における GalFuc 糖鎖エピトープの存在の検証

自由生活性の線虫 *C. elegans* において、ガレクチン-2 が GalFuc への結合依存的に傷害的に作用することが明らかになったため、寄生性線虫にも GalFuc エピトープが存在するか、つまり、ガレクチン-2 が寄生性線虫に対しても抑制的に働く可能性があるか、調べました。ガレクチン-2 結合性タンパク質をブタ回虫 *Ascaris suum* 抽出液から精製した結果、ガレクチン-2 が回虫の糖タンパク質に結合すること、それら糖タンパク質は GalFuc エピトープを持つこと、がわかりました。また、モデル寄生性線虫 *Nippostrongylus brasiliensis* およびパハン系状虫 *Brugia pahangi* の抽出液を調製し、抗 GalFuc エピトープ抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、これらの寄生虫にも GalFuc エピトープが存在することを示しました。

以上、本研究課題において、ガレクチン-2 は線虫特異的な GalFuc エピトープを含む糖鎖と相互作用し、線虫に対し抑制的に作用すること、また、様々な寄生性線虫にも GalFuc が存在することを明らかにしました。

GalFuc エピトープはヒトやマウスなどの哺乳類には存在しませんが、GalFuc エピトープとの結合に重要なアミノ酸残基は、ガレクチン-2 タンパク質において種を越えて保存されています。このことはガレクチン-2 が寄生虫感染において重要な役割を担ってきた可能性を示唆しています。今後、ガレクチン-2 は、GalFuc エピトープとの相互作用を介して、様々な寄生性線虫に対して抑制的に働くか、検証が必要と考えられます。

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)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Takeuchi T., Galectins in invertebrates with a focus on *Caenorhabditis elegans*, Trends Glycosci. Glycotechnol. (査読有), 30(172), 2018, SE67-SE74 (DOI: 10.4052/tigg.1735.1SE)

2. 武内智春, 線虫などの無脊椎動物のガレクチン, Trends Glycosci. Glycotechnol. (査読有), 30(172), 2018, SJ25-SJ32 (DOI:

10.4052/tigg.1735.1SJ)

3. 武内智春, 荒田洋一郎, 寄生性線虫の糖鎖エピトープとガレクチン, BIO Clinica (査読無), 32(4), 2017, 68-70

4. Takeuchi T., Arata Y., Kasai K., Galactose 1-4fucose: A unique disaccharide unit found in N-glycans of invertebrates including nematodes, Proteomics (査読有), 16(24), 2016, 3137-3147 (DOI: 10.1002/pmic.201600001.)

[学会発表](計 2 件)

1. 武内智春, 田村真由美, 畑中朋美, 荒田洋一郎, ガレクチン-2 の Galactose 1-4Fucose エピトープとの相互作用とその線虫傷害活性, 第 36 回日本糖質学会年会(2017 年)

2. 武内智春, 田村真由美, 荒田洋一郎, ガレクチン-2 が線虫 *Caenorhabditis elegans* の成長に与える影響, 第 35 回日本糖質学会年会(2016 年)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 智春 (Takeuchi Tomoharu)
城西大学・薬学部・助教
研究者番号: 90439563

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()