

平成22年 5月25日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890007

研究課題名（和文） 感染症診断への応用を目指す糖ペプチドアレイの開発

研究課題名（英文） Development of glycopeptide array aiming for diagnosis of infectious diseases

研究代表者

加藤 健太郎 (KATO KENTARO)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・博士研究員

研究者番号：50508885

研究成果の概要（和文）：MUC2 ムチンのアミノ酸配列を元に56種類のパターンでN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が付加したペプチドを合成し、プレート上に固相化した。植物レクチンであるVVA-B4のGalNAc付加MUC2ペプチドに対する親和性をELISA法で測定した。その結果、GalNAc付加MUC2ペプチドがプレート上に固相化されており、VVA-B4のペプチドに対する親和性がMUC2ペプチド上のGalNAc付加位置により異なることが明らかとなった。GalNAc付加MUC2ペプチドを固相化したプレートを作成できたことにより、感染寄生虫レクチンのGalNAc付加MUC2ペプチドに対する親和性を測定することが可能になった。

研究成果の概要（英文）：MUC2 mucin (glyco)peptides with fifty-six patterns of N-acetylgalactosamine (GalNAc) residue attachment were synthesized and immobilized on the plate. Binding affinities of VVA-B4, a plant lectin, toward GalNAc attached MUC2 peptides were measured using ELISA. The results suggested that the affinity was defined by the sites of GalNAc attachment on the peptides. The plate with GalNAc attached MUC2 peptides was successfully developed and this made possible for measuring the affinities of parasite lectins toward GalNAc attached MUC2 peptides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,280,000	384,000	1,664,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,480,000	744,000	3,224,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：糖ペプチドアレイ・レクチン・感染症

1. 研究開始当初の背景

感染寄生虫の中には寄生虫上の糖鎖認識分子（レクチン）を用いて生体内粘膜上皮に

存在する粘液構成タンパク質（ムチン）に接着し、細胞内侵襲することで感染するものが

存在する。例えばヒトに対して赤痢アメーバは大腸にてムチン2 (MUC2) 上の糖鎖を介して感染し出血性大腸炎を引き起こし、クリプトスポリジウムパルブムは小腸にてムチン2上の糖鎖を介して感染し重度の下痢を引き起こす。

研究代表者は植物レクチンと18種類のMUC2糖ペプチドの親和性がペプチド上の糖の付加数ではなく、付加位置により決まっていることを明らかにした [Kato K et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **in press** (2008)]ことから、これらの寄生虫レクチンにもそれぞれ糖ペプチド認識特異性が存在し、同じ糖鎖構造を認識していてもコアタンパク質上の付加位置により認識の仕方が異なると考えた。

現在までクリプトスポリジウムに関しては特異的抗体を用いた検出キットが存在するものの赤痢アメーバに関しては検出キットが存在しない。また感染寄生虫レクチンの糖ペプチド認識特異性の違いを利用した検出キットも存在しない。

そこで研究代表者は各寄生虫を検出可能な、ムチン構造を基にした新規糖ペプチドアレイの作成ができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) MUC2糖ペプチドアレイの構築

所属する研究室において開発されたペプチドアレイ作成技術(未発表)と糖付加ペプチド合成技術[Fumoto M et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11804-11818 (2005); Naruchi K et al., *J. Org. Chem.*, **71**, 9609-9621 (2006)]を応用してMUC2糖ペプチドアレイを作成する。

(2) MUC2糖ペプチドアレイの検証

作成した糖ペプチドアレイを用いて組み換え型赤痢アメーバレクチン、組み換え型ク

リプトスポリジウムパルブムレクチン、植物レクチンによるMUC2糖ペプチド認識プロファイルがどのように異なるかを明らかにし、診断への応用が可能か検証する。

3. 研究の方法

(1) アレイ上に固相化するMUC2糖ペプチドの作成

赤痢アメーバレクチンとクリプトスポリジウムレクチンはともにN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)構造がコアペプチド上にあるムチンを認識し、両寄生虫の感染のある小腸・大腸ともにMUC2の発現が高いことから、GalNAcがコアペプチド上の様々な位置に付加したMUC2糖ペプチドを作成しアレイ上に固相化する。

MUC2糖ペプチド合成方法は当研究室から発表された糖ペプチド合成技術[Fumoto M et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11804-11818 (2005); Naruchi K et al., *J. Org. Chem.*, **71**, 9609-9621 (2006)]を用いる。500~600種類のGalNAc付加位置の異なるMUC2糖ペプチドを化学合成により作成しHPLCにより精製する予定である。この方法は確立されているため計画通りに進むと考えられる。

(2) 組み換え型寄生虫レクチンの発現

赤痢アメーバおよびクリプトスポリジウムのcDNAは東京大学大学院薬学系研究科生体異物学教室・入村達郎教授から供与していただく。また、大腸菌発現用ベクターにそれぞれのレクチン遺伝子を組み込んだベクターコンストラクト(His-tag)も供与していただく予定である。大腸菌からの発現が予定通りに進まない場合は昆虫細胞あるいは酵母を用いた発現系を検討する予定である。

(3) アレイ上へのMUC2糖ペプチドの固相化

MUC2糖ペプチドのアレイ上への固相化は所属する研究室において開発されたペプチ

ドアレイ作成技術（未発表）を用いる。この際に糖付加によりペプチドのチップへの固相化率が低くなる可能性や糖ペプチド間で固相化率に差がみられる可能性がある。そのときは糖ペプチドにスペーサーアミノ酸配列あるいはスペーサー構造を付与しチップへの固相化量が糖ペプチド間で一定になるようにする。

(4) MUC2 糖ペプチドアレイを用いた組み換え型寄生虫レクチンの糖ペプチド認識特異性の解析

解析方法は所属する研究室において開発されたペプチドアレイ解析技術（未発表）を参考にする。各レクチンに対するモノクローナル抗体を用いた検出は各抗体のレクチンに対する親和性が異なる可能性があるので抗 His-tag 抗体を用いる。この方法も確立されているため計画通りに進むと考えられる。

4. 研究成果

対象となる寄生虫（赤痢アメーバおよびクリプトスポリジウム）レクチンの発現および単離精製を行った。東京大学大学院薬学系研究科生体異物学教室・入村達郎教授から両寄生虫レクチンの cDNA が組み込まれたベクターコンストラクトを数種類いただいた。様々な発現系の中から大腸菌を用いて両レクチンを発現することができ、大量培養した大腸菌体からの両レクチンの単離および精製を行った。大腸菌で発現させた赤痢アメーバレクチンの活性測定はアジアロ BSM をコーティングした ELISA 法を用いて行った。残念ながら比活性の高い赤痢アメーバレクチンを得ることはできなかった。クリプトスポリジウムレクチンに関しては精製までできた。糖ペプチドアレイに固相化する MUC2 糖ペプチドの合成に関しては大腸・小腸に主に発現している MUC2 ムチンのタンデムリピート部のア

ミノ酸配列（PTTTPITTTTTVTPTPTGTQT）を参考にし、PTTTPITTTTTV というペプチド配列を合成した。また、PTTTPITTTTTV ペプチドに対し 56 種類のパターンで N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を付加したペプチドを合成した。大腸菌で大量発現させた赤痢アメーバレクチンの活性はアジアロ BSM に対しては確認できたものの非常に弱かったため、植物レクチンである VVA-B4 レクチンのプレート上に化学的に固相化した GalNAc 付加 MUC2 ペプチドに対する親和性を ELISA 法で測定した。その結果、GalNAc 付加 MUC2 ペプチドがプレート上に固相化されており VVA-B4 のペプチドに対する親和性が MUC2 ペプチド上の GalNAc 付加位置により異なることが明らかとなった（図 1）。

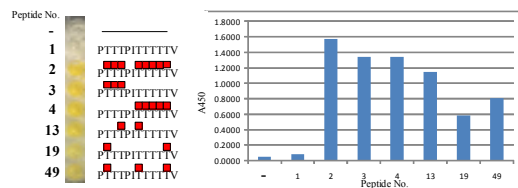


図 1 VVA-B4 の GalNAc 付加 MUC2 ペプチドに対する親和性

GalNAc 付加 MUC2 ペプチドを固相化したプレートを作成できたことにより、感染寄生虫レクチンの GalNAc 付加 MUC2 ペプチドに対する親和性を測定することが可能になった。将来的に寄生虫レクチン間での親和性の違いを利用した感染症診断を行うことができると考えられる。

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 1 件）

1. 加藤健太郎、『生体におけるムチン型糖鎖の役割』、第 3 回 原虫感染免疫研究会、2010 年 3 月 26 日、長崎大学（長崎県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 健太郎 (KATO KENTARO)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
博士研究員
研究者番号：50508885

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし