

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790460

研究課題名(和文)糖ペプチドを用いた腸管寄生原虫による糖鎖認識機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the carbohydrate recognition mechanisms by intestinal protozoa using MUC2 glycopeptides

研究代表者

加藤 健太郎 (Kato, Kentaro)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：5050885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：腸管寄生原虫の中で、赤痢アメーバは大腸、クリプトスポリジウムは小腸の腸管粘膜糖鎖を介して接着・感染する。これら原虫の糖鎖認識分子(レクチン)を組換え型タンパク質として大腸菌に発現させ、56種類の合成糖ペプチドとの親和性の違い研究することで感染の場の違いの原因を明らかにしようと考えた。

しかしながら、糖鎖認識能を有する赤痢アメーバレクチンを得ることが困難であったため、赤痢アメーバ細胞膜と人工糖タンパク質を用いた親和性測定系を構築した。この系を用いて今まで不明であった、マウス系統間における赤痢アメーバに対する感染感受性の違いの原因を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Among intestinal protozoan parasites, *Entamoeba histolytica* infects large intestine and *Cryptosporidium parvum* infects small intestine via carbohydrates of the mucus. To elucidate the reason for this difference in the site of infections, recombinant lectins expressed in *E. coli* and 56 kinds of synthetic glycopeptides were prepared.

However, it was difficult to obtain an active *Entamoeba* lectin. Therefore, a new assay using *Entamoeba histolytica* membrane and neo-glycoproteins was established. The reason for mouse strain-dependent susceptibility to *Entamoeba histolytica* infection was elucidated by using this assay.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：原虫 腸管粘膜糖鎖

1. 研究開始当初の背景

腸管寄生原虫の中には原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糖タンパク質(ムチン)に接着し、組織内侵入することで感染するものが存在する。例えば赤痢アメーバは大腸にてムチン上の糖鎖を介して接着・感染し、重篤化した場合は出血性大腸炎を引き起こす。またクリプトスポリジウムパルブムは小腸にてムチン上の糖鎖を介して接着・感染し、重篤化した場合は重度の下痢を引き起こす。小腸および大腸の粘液を構成する主要ムチンはムチン2(MUC2)であるため、赤痢アメーバおよびクリプトスポリジウムはMUC2上の糖鎖構造あるいは糖鎖付加パターンを認識して接着・感染すると考えられた。

研究代表者は以前に植物レクチンと酵素学的に作成した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.*, **371**, 698-701 (2008)]。その結果より腸管寄生原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糖鎖付加位置により認識の仕方が異なると考えた。

そこで研究代表者は各腸管寄生原虫を検出可能な寄生原虫感染診断ならびに治療に結びつくムチン構造を基にした新規糖ペプチド固相化プレートを作成するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は大腸に接着・感染する赤痢アメーバと小腸に接着・感染するクリプトスポリジウム上の糖鎖認識分子(レクチン)の糖鎖認識特異性を解明することにある。また、各腸管寄生原虫レクチンの糖鎖認識特異性を明らかにすることで将来的に腸管寄生原虫の感染予防ならびに治療法の新規開発につながる基礎データを出すことも目的とした。

3. 研究の方法

(1) MUC2糖ペプチドの合成ならびにプレートへの固相化

MUC2糖ペプチド合成方法は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)]に従い、56パターンでGalNAcが付加したMUC2糖ペプチドを合成済みであった。MUC2糖ペプチドのプレートへの固相化はOhyabuらの論文[Ohyabu N et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 17102-9 (2009)]ならびに住友ベークライト株式会社が用いている方法を参考に行った。

(2) 組換え型腸管寄生原虫レクチンの発現 赤痢アメーバおよびクリプトスポリジウム

のcDNAならびに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)は東京大学大学院薬学系研究科生体異物学教室から供与していただいた。

(3) MUC2糖ペプチドを用いた感染阻害実験

大腸菌を用いて発現したレクチンが糖鎖認識能を有しなかったため、組換え型レクチンの代替として赤痢アメーバ原虫からレクチンの局在する細胞膜を得ることとした。その細胞膜上のレクチンに糖鎖認識能が認められたため、人工糖タンパク質との親和性を検出する系を構築し、56種類の糖ペプチドのうち、赤痢アメーバ細胞膜と人工糖タンパク質との結合を阻害するものを探索することとした。

4. 研究成果

[研究の主な成果]

(1) MUC2糖ペプチドの合成ならびにプレートへの固相化

ヒト(MUC2)のアミノ酸配列を元に合成したMUC2糖ペプチドのプレートへの固相化は予備実験段階ではあるが、住友ベークライト株式会社の推奨する方法で行うことができ、植物レクチンの1種類であるPNAにより、プレート上の糖ペプチドが認識されることを確認した(図1)。また、PNAのMUC2糖ペプチドに対する親和性は糖ペプチド上の糖鎖の付加数ではなく、付加位置に影響を受けることが示唆された。

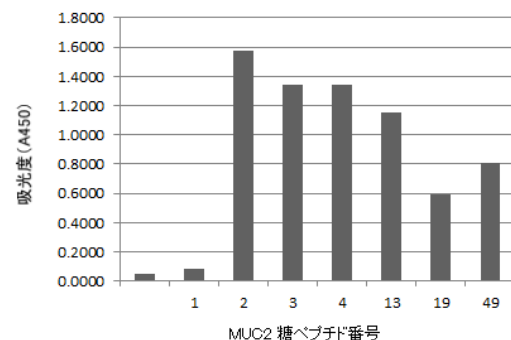


図1 MUC2糖ペプチドに対するPNAの親和性解析結果

(2) 組換え型腸管寄生原虫レクチンの発現

大腸菌を用いて赤痢アメーバレクチン(HgI)ならびにクリプトスポリジウムレクチン(CgI)の組換え型タンパク質を得ることができた(図2)。この組換え型レクチンはHisタグを有しており、抗Hisタグ抗体を用いたELISAやウェスタンブロットにより検出できるように設計した。本研究においては精製した組換え型タンパク質とMUC2糖ペプチド固相化プレートを用いて、各レクチンの糖鎖認識特異性を明らかにしようと考えた。

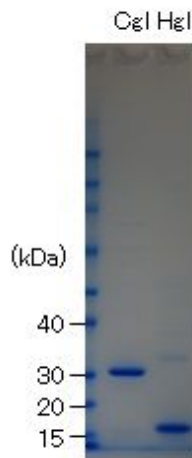


図2 Hgl および Cgl の CBB 染色像

しかしながら、組換え型 Hgl の糖鎖認識能を検出することができなかつたため、糖タンパク質および赤痢アメーバ細胞膜を用いた実験系への変更を試みた。

(3) MUC2 糖ペプチドを用いた感染阻害実験

赤痢アメーバから調整した細胞膜の人工糖タンパク質固相化プレートに対する親和性を測定する系を確立することができた。この系を用いて赤痢アメーバに対するマウス系統間での感染感受性の違いが大腸ムチン上の糖鎖におけるシアル酸によるものであることを明らかにした(5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕)。しかしながら、本研究期間内に MUC2 糖ペプチドを用いた感染・接着阻害実験を完了することができなかった。

[国内外における位置づけとインパクト]

本研究によって赤痢アメーバ感染において腸管粘膜糖鎖上のシアル酸が重要な役割を果たしていることを示すことができた。このことは今後の研究遂行上、重要な基礎データとなる。また、シアル酸がない糖ペプチドあるいは糖タンパク質が赤痢アメーバ感染予防薬あるいは治療薬として利用できる可能性を示すものである。

[今後の展望]

本研究において構築できた実験系を用いて MUC2 糖ペプチドに対する赤痢アメーバ細胞膜の親和性を測定していこうと考えている。Hgl 以外の赤痢アメーバレクチンである、Igl に関して、予備実験段階ではあるが、レクチン活性を示唆するデータを得ており、Igl を標的タンパク質に含めて今後も本研究を継続していく予定である。

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)

[雑誌論文](計3件)

Kato K、Takegawa Y、Ralston KS、

Gilchrist CA、Hamano S、Petri WA Jr、Shinohara Y、Sialic acid-dependent attachment of mucins from three mouse strains to *Entamoeba histolytica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*、査読有、436、2013、pp. 252-258
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.05.085.

[学会発表](計10件)

加藤 健太郎、Identification of a carbohydrate recognition domain of the intermediate subunit of *Entamoeba histolytica* lectin (Igl)、第36回日本分子生物学会年会 2013年12月4日、兵庫県神戸市

加藤 健太郎、赤痢アメーバ感染における宿主粘膜糖鎖の役割、第11回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2013年10月3日、長崎県長崎市

加藤 健太郎、シアル酸依存的な *Entamoeba histolytica* 感染感受性、第82回日本寄生虫学会大会、2013年3月31日、東京都文京区

加藤 健太郎、Mucin glycosylation dependent susceptibilities of three mouse strains against *Entamoeba histolytica* infection、第35回日本分子生物学会、2012年12月14日、福岡県福岡市

加藤 健太郎、Sialic acid dependent susceptibilities of three mouse strains against *Entamoeba histolytica* infection、International Symposium of Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences、2012年11月30日、東京都文京区

加藤 健太郎、マウス腸管ムチンの糖鎖構造に関する研究、第81回日本寄生虫学会大会、2012年3月24日、兵庫県西宮市

加藤 健太郎、赤痢アメーバの感染性がマウス系統間で異なるのは何故?、感染症若手フォーラム、2012年2月4日、長崎県長崎市

加藤 健太郎、A comparative study on glycosylation patterns of mucus glycoproteins among three mouse strains、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日・15日、神奈川県横浜市

加藤 健太郎、A comparative study on glycosylation patterns of mucus glycoprotein among three mouse strains、第19回分子寄生虫学ワークショップ、2011年10月23日、兵庫県神戸市

加藤 健太郎、マウス腸管ムチンの糖鎖構造に関する研究、第80回日本寄生虫学会大会・第22回日本臨床寄生虫学会大会、2011年7月17日、東京都港区

〔図書〕(計1件)

加藤 健太郎 他、オーム出版、感染症
事典、2012、533-536

〔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

<http://research.jimu.nagasaki-u.ac.jp/IST?ISTActId=FINJPDetaiI&ISTKidoKbn=&ISTErrorChkKbn=&ISTFormSetKbn=&ISTTokenChkKbn=&userId=100000518>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 健太郎 (KATO, Kentaro)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号：50508885