

# 条虫類の糖脂質および糖タンパク質糖鎖解析

*Carbohydrate structure of glycosphingolipids and glycoproteins isolated from tapeworms*

川上 泰

麻布大学大学院環境保健学研究科

Yasushi Kawakami

Graduate School of Environmental Health, Azabu University

**Abstract:** Glycosphingolipids (GSLs) can be expected to be involved in the mediation of host-parasite interactions, as are functioning in bacterial and viral infection. In this context, we have been studying GSLs of cestodes to elucidate underlying biochemical mechanisms of parasitism. We previously reported unique GSLs, SEGLx and GalSEGLx, from the Pseudophyllidean tapeworms (*Spirometra erinaceieuropaei*, *Diphyllobothrium nihonkaiense*, *D. hottai* and *Diplogonoporus balaenopterae*). They were characterized by a carbohydrate structure Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -3Gal. We proposed a term “spirometosides” for glycolipids having this core. We also found the absence of these glycolipids in Cyclophyllidean tapeworms such as *Hymenolepis diminuta* and *Dipylidium caninum*. In this study, GSLs were isolated from adults of the other Pseudophyllidean tapeworm *D. macroovatum*. The purified GSLs were characterized by TLC-immunostaining with AK97 and proved that *D. macroovatum* also has spirometosides. This finding confirms that spirometosides have a taxonomical significance, being characteristic of Pseudophyllidea. We also found the glycoprotein having sugar chain same as “spirometosides” in these worms. Immunohistochemical examination showed that AK97 stained tegment of *S. erinaceieuropaei*, and almost tissues of *D. hottai*.

## 1. 目的

一般に生体内の認識反応においては、細胞表面に存在する糖鎖が重要な役割を果たすことが知られており、細胞の付着や認識などの相互作用に関与している。細菌、リケッチア、クラミジアなどの感染においては、これらの細胞表面にあるレクチンが宿主細胞のある糖鎖を認識することなども知られていることから、糖鎖が宿主への感染においても重要な役割を果たしていると考えられている。これまで寄生条虫を材料として、寄生現象のメカニズムを知るべく多くの生化学的な実験を行ってきた。特に感染現象に強く関与していると思われる糖脂質に関する研究が多く、中でも注目すべき成果はマンソン裂

頭条虫 *Spirometra erinaceieuropaei* のプレロセルコイドから自然界に存在する既知の糖鎖系列のいずれにも属さない糖鎖系列が、この条虫から見つかったことである。この基本骨格を持つ一連の糖脂質は“spirometosides”と呼ぶことが提唱されている [1]。またスフィンゴ糖脂質は、細胞膜に糖鎖部分を細胞表面に露出した形で局在しており、細胞接着や細胞分化に何らかの役割を果たしていると考えられている [2]。

本研究では、クジラに寄生する大卵裂頭条虫 *Diphyllobothrium macroovatum* にも “spirometosides” が存在するかどうか、また既にスピロメト系列糖脂質の存在を報告しているマンソン裂頭条虫および堀田裂頭条虫について、この糖鎖をもつ糖脂質および糖

タンパク質の虫体における局在性についても検討した。

## 2. 方法

実験に用いた大卵裂頭条虫の成虫は、オホーツク海及び北西北太平洋で捕獲したミンククジラより得られた成虫体を使用した。マンソン裂頭条虫の幼虫(プレロセルコイド)はシマヘビの皮下から、堀田裂頭条虫の幼虫はチカの内臓から採取した。両種の成虫は幼虫をハムスターに感染させ、腸管から得られた成虫を使用した。

### (1) 標準糖脂質 (Std.)

[ガラクトシルセラミド (GalCer), ラクトシルセラミド (LacCer), グロボトリアオシルセラミド (Gb3Cer), グロボテトラオシルセラミド (Gb4Cer) の混合物] は Matreya (USA) より購入したものを使用した。

### (2) 糖脂質の単離・精製

Iriko *et al.* (2002) の方法に従い、虫体の中性糖脂質を単離・精製した [3]。

### (3) 薄層クロマトグラフィー (TLC)

薄層プレートは HPTLC Silica gel 60 (E. Merk), 展開溶媒はクロロホルム-メタノール-水混液 (60:35:8, v/v/v), 糖脂質の検出にはオルシノール硫酸試薬を用いた。

### (4) 薄層クロマトグラフィー/免疫染色 (TLC-immunostaining)

糖脂質を展開した TLC プレートを経乾燥後、0.4% ポリイソブチルメタクリレート含有クロロホルム-ヘキサン混液 (1:9, v/v) に1分間浸してプラスチックコーティングを施した。乾燥後、湿潤箱内にて一次抗体 (AK97) で30分間反応させた。反応後は、PBS で余分な一次抗体を洗浄し、二次抗体 (anti-mouse IgM) で30分間反応させた。抗体を PBS で洗浄し、発色試薬を用いて発色させた。発色試薬にはコニカイムノステイン HRP-1000 (Konica, Japan) を用いた。なお、抗体希釈溶媒には、1% BSA 含有 PBS 溶液を使用した。

### (5) 虫体タンパク質の抽出

採取した虫体を PBS で数回洗浄し、Lysis Buffer (1% Triton 7 ml, 1 mg/ml Aprotinin 1  $\mu$ l, 200 mM PMSF 70  $\mu$ l) を加え、氷中で20分保存した後に、ホ

モジナイザーでホモジネートした。その後4℃, 2500 rpm, 5分間遠心し、上清をタンパク抽出液とした。

### (6) SDS-PAGE

SDS-PAGE には、12% および 16% 分離ゲルと 5% 濃縮ゲルを用いた。各ウェルに同一のタンパク量に揃えたサンプルをアプライし、泳動は 130 V, 70~90分間行った。

### (7) ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE 後のゲルを Mini Trans-Blot (BIO-RAD) で 100 V, 2.5時間氷中で PVDF 膜に転写した。転写したメンブレンは、5% スキムミルクに浸し、4℃で一晩ブロッキングした。ブロッキング後 TTBS で洗浄し、一次抗体で 1.5時間反応させた。洗浄後、二次抗体で1時間反応させ、洗浄後化学発光により検出した。発光は Super Signal West Pico Chemiluminescent (Pierce) を用い、検出は Chemi Stage (KURABO) を使用した。

### (8) 免疫組織化学染色

#### 1) 凍結切片の作製

10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定した虫体を、脱ホルマリン試薬で3日間処理した。約5mmの長さで切断した虫体はティッシュテック O.C.T コンパウンドで包埋し、液体窒素で急速凍結させてブロックを作製した。ブロックはミクロトーム HM505N (Leica) で薄切し、7  $\mu$ m の連続切片を作製した。なお、スライドガラスはシランコートをしたものを用いた。

#### 2) 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色には蛍光抗体法を用いた。まず、作製した凍結組織切片を PBS で10分間洗浄して O.C.T コンパウンドを取り除いた。2.5% BSA 含有 PBS で10分間ブロッキングを行った後、一次抗体 (AK97) で1時間反応させ、反応終了後 PBS で洗浄した。その後、暗所で二次抗体 [FITC 標識 anti-mouse IgM (Santa Cruz)] と室温で30分間反応させた。反応終了後に PBS で洗浄し、VECTASHIELD™ (Vector Laboratories) で封入し、落射蛍光顕微鏡 (DM500B, Leica) で鏡検した。

ウェスタンブロッティングおよび免疫組織化学染色で使用した、一次抗体 AK97 は当研究室で作成したものを使用した [4]。AK97 はスピロメトシドの非

還元末端の3糖 [Gal $\beta$ 1-4 (Fuc $\alpha$ 1-3) Glc] を認識するマウスモノクローナル抗体である。

### 3. 結果と考察

TLC/immunostaining の結果、大卵裂頭条虫から抽出した糖脂質と AK97 が反応した (Fig. 1, lane 2)。このことから大卵裂頭条虫にもスピロメト系列糖脂質が存在することが明らかとなり、この糖脂質が擬葉目に特異的に存在することが強く示唆された。次に "spirometosides" と同様の糖鎖をもったタンパク質の存在を調べるため、虫体からタンパク質を抽出し SDS-PAGE 後、AK97 を用いたウエスタンブロッティングを行った。その結果、低分子領域に反応が認められた (Fig. 2)。この結果から "spirometosides" と同様の糖鎖が虫体に存在することがわかった。そこで、これら一連の糖脂質および糖タンパク質の虫体における局在性を調べるため、AK97 を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、マンソン裂頭条虫と堀田裂頭条虫において反応に差が認められ、前者は成虫および幼虫とも外被に、堀田裂頭条虫では虫体全体に反応が認められた (Fig. 3)。この結果の詳細については今後検討していく予定である。

一般に糖鎖は、核酸やタンパク質と同様、その構造の中に生物学的な情報を担っているため、体内の

認識反応において重要な役割を果たすことが知られている。また、細胞表面に存在する糖鎖は、糖タンパク質、糖脂質などのようにペプチドや脂質と共有結合して存在しており、微生物、ウイルスでは、細胞壁に存在する特異的な糖鎖が宿主内の糖タンパク質と結合することで細胞間応答や免疫応答に重要な役割を担っていることが報告されている。このようなことから、条虫類の細胞上に存在しているスピロメトシドが寄生虫感染に何らかの役割を果たしている可能性は高いが、実際にどのような作用機序をしているのか不明な点が多く、今後も引き続き研究を行っていく必要があると考えられた。

(k Da)

15

M A B C D

M: Molecular marker

A: *Spirometra erinaceieuropaei* (adult)

B: *S. erinaceieuropaei* (plerocercoid)

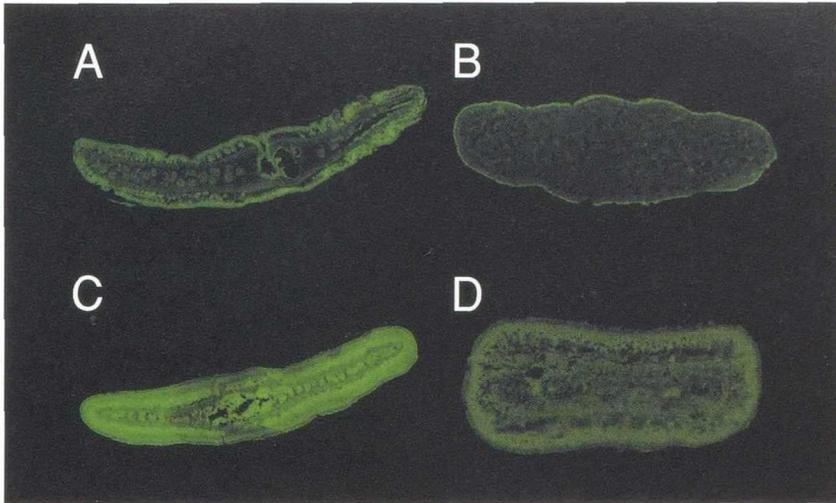
C: *Diphyllobothrium hottai* (adult)

D: *D. hottai* (plerocercoid)

Fig. 2 Western blotting analysis of worm protein with AK97



Fig. 1 TLC and TLC-immunostaining with AK97



A: *Spirometra erinaceieuropaei* (adult)  
 B: *S. erinaceieuropaei* (plerocercoid)  
 C: *Diphyllobthrium hottai* (adult)  
 D: *D. hottai* (plerocercoid)

Fig. 3 Immunofluorescence panels of *Spirometra erinaceieuropaei* and *Diphyllobthrium hottai* with AK97.

#### 4. 要 約

大卵裂頭条虫にもスピロメト系糖脂質が存在することが明らかとなり、この糖脂質が擬葉目に特異的に存在することがわかった。免疫組織化学染色では、マンソン裂頭条虫と堀田裂頭条虫において反応に差が認められ、前者は成虫および幼虫とも外被に、堀田裂頭条虫では虫体全体に反応が認められた。

#### 文 献

- 1) Kawakami, Y., Nakamura, K., Kojima, H., Suzuki, M., Inagaki, F., Suzuki, A., Ikuta, J., Uchida, A., Murata, Y., Tamai, Y.: Eur. J. Biochem., 239, 905-911. (1996)
- 2) Hakomori, S.: J. Biol. Chem., 265, 18713-18716. (1990)
- 3) Iriko, H., Nakamura, K., Kojima, H., Iida-Tanaka N., Kasama, T., Kawakami, Y., Ishizuka I., Uchida, A., Murata, Y., Tamai, Y.: Eur. J. Biochem., 269, 3549-3559. (2002)
- 4) Yanagisawa M., Kojima H., Kawakami Y., Iriko H., Nakamura T., Nakamura K., Uchida A., Murata Y., Tamai Y.: Mol Biochem Parasitol, 102, 285-297. (1999)