

# 条虫類に存在する糖脂質の機能解析

*Role of glycosphingolipids isolated from tapeworms*

川上 泰, 内田明彦, 森田重光

麻布大学大学院 環境保健学研究科 環境保健科学 専攻

Yasushi Kawakami, Akihiko Uchida, Sigemitsu Morita

Course of Environmental Health Science, Azabu University

**Abstract.** Detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes (DIGs) formed as microdomains in the cell membranes have been shown to contain signalling molecules, cholesterol, glycosphingolipids and caveolae. DIGs can be expected to be involved in the mediation of host-parasite interactions. In this context, we have been studying DIGs of cestodes to elucidate underlying biochemical mechanisms of parasitism.

We previously reported unique Glycosphingolipids, SEGLx and GalSEGLx, from the Pseudophyllidean tapeworms (*Spirometra erinaceieuropaei*). They were characterized by a carbohydrate structure Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -3Gal. We proposed a term "spirometosides" for glycolipids having this core (Kawakami et al. Eur. J. Biochem. 1996; 239; 905-11) and we also successively established a mouse monoclonal IgM antibody directed to SEGLx, and termed AK97 (Yanagisawa et al. Mol Biochem Parasitol. 1999; 102; 285-297).

In this study, we analyzed worm proteins in DIC by western blotting using AK97. Fraction 6 and Fraction 7 were reacted with AK97. As anticipated, glycolipids were also present same fractions. Findings from this and our previous studies indicate that carbohydrate structures of "spirometosides" play significant roles in parasitic infection.

## 1. 目的

寄生虫と宿主の特異関係を決定する因子解明への生化学的アプローチとして、寄生条虫に存在する糖脂質に着目し寄生現象と寄生虫糖脂質糖鎖との関わりについて解明することを目的として研究を行った。生体膜上には糖脂質やタンパク質が濃縮する膜マイクロドメインが存在していることが注目されており、この膜ドメインはコレステロール、スフィンゴミエリンなどの脂質や糖脂質に富み、GPI アンカータンパク質なども濃縮することが知られている。一般的に、膜マイクロドメインは、界面活性剤に不溶、脂質を多く含む低密度のような特徴を持つことから、シヨ糖密度勾配遠心法によって低密度側に界面活性剤

不溶性の画分として単離することができ、条件により特性の異なる膜マイクロドメインが抽出される。最近ではトリパノソーマ科原虫、マラリア原虫においても宿主内への侵入や生存における過程でカベオラと呼ばれる膜マイクロドメインが注目されてきている [1, 2]。また吸虫類に属する住血吸虫科の生体膜上からもカベオラの存在が初めて報告された [3]。カベオラは、コレステロールとともにカベオリンという構造形成に不可欠な膜タンパク質と会合しており、細胞表面でフラスコ型の小さな窪み構造をしている。この陥入部位には細胞外分子と結合するレセプター分子が存在し、各種のシグナル伝達分子を集積することが知られており、宿主体内で住血吸虫が生存するために重要な役割を担っていることが示唆されて

いる。

我々が報告した糖脂質 (SEGLx) は、裂頭条虫に特有に存在し、虫体の外皮に局在していることから寄生現象に強く関与していることが考えられている。今回は、この SEGLx と同様の糖鎖をもったタンパク質が存在するか否かについて、生体膜上で集合してできると考えられている微小膜領域である膜マイクロドメイン Detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes (以下 DIGs) を調製し、糖脂質およびタンパク質糖鎖について実験を行った。

## 2. 方法

実験には日本産シマヘビ *Elaphe uadrivirgata* の皮下より採取したマンソン裂頭条虫のプレロセルコイドを使用した。採取した虫体を TNE 溶液 [1M-Tris-HCl (pH7.5) 12.5 ml, NaCl 4.383 g, 0.5MEDTA (pH7.5) 5 ml を蒸留水で 500 ml にメスアップ] で数回洗浄した。虫体をガラスホモジネーターの外筒に移し、Lysis Buffer 溶液 (1% Triron 7 ml, 1 mg/ml Aprotinin 1  $\mu$ l, 200 mM PMSF 70  $\mu$ l) を加え、氷中で 30 分保存した後に、ホモジナイザーで虫体をホモジネートし、50 ml のポリチューブに移して 4°C, 3,000 rpm, 10 分間遠心した。上清のみをタンパク抽出液とした。タンパク抽出液は使用直前まで -20°C で保存した。

DIGs の調製するため、抽出したタンパク質 1 ml, 85% スクロース 1 ml を Centrifuge Tubes (BECKMAN) に入れ、ボルテックス後、35% スクロース 5.4 ml, 5% スクロース 4.2 ml の順にゆっくりと添加した。SW 式超遠心機 (BECKMAN COULTER) で 4°C, 34,500 rpm, 18 時間超遠心した。遠心後、Centrifuge Tubes の上部から 1 画分とし、1 ml ずつ 1.5 ml チューブに取り分け、13 画分採取した (以下画分 1~画分 13)。サンプルは使用直前まで -20°C で保存した。

SDS-PAGE は、16% 分離ゲルと 5% 濃縮ゲルを用いた。サンプルは、Micro BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford) を用いてタンパク定量を行い、均一量を 130 V, 90 分間泳動した。

SDS-PAGE 後、100 V, 3 時間ウエスタンブロッティングを行った。メンブレンを 4°C で一晩ブロッティング後、TBS で洗浄し一次抗体 [AK97] と 1.5 時間反応させた。洗浄後、二次抗体 [Goat Anti-Mouse

IgM, HRP Conjugate] と 1 時間反応させた。最後に化学発光検出を行うため発光基質として、Super Signal West Pico Chemiluminescent (Pierce, Rockford) を用い 5 分間ルミノール反応させた。検出は、Chemi Stage (KURABO) を使用した。

薄層クロマトグラフィーは HPTLC Shilica gel 60 (E. Merk) プレートを用い、展開溶媒は CMW 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。

薄層クロマトグラフィー免疫染色 (TLC-immunostaining) は糖脂質を展開した TLC プレートを、風乾後に 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 分間プラスチックコーティングを行い、湿潤箱内にて一次抗体 [AK97] と 30 分間反応させた。洗浄後、30 分間室温で二次抗体 [Goat Anti-Mouse IgM, HRP Conjugate] と反応させた。発色試薬にはコニカイムノステイン HRP-1000 (Konica) を用いた。

ウエスタンブロッティングおよびスピロメト系糖脂質の確認に使用した一次抗体は、当研究室で作成した抗スピロメトシド抗体 (モノクローナル抗体) である AK97 を用いた [4]。発色試薬にはコニカイムノステイン HRP-1000 (Konica) を用いた。

## 3. 結果と考察

シヨ糖密度勾配遠心法で分離した画分 1~画分 13 について、タンパク量を揃えて SDS-PAGE を行い、その後 AK97 によるウエスタンブロッティングを行った結果、画分 6, 7 に AK97 に反応する糖タンパク質が存在していることがわかった (Fig. 1)。さらにこれらの各分から糖資質を抽出し、オルシノール試薬および AK97 による薄層クロマトグラフィー免疫染色を行ったところ、SEGLx を含む糖脂質も同一付近に存在していることが認められた (Fig. 2)。今回の結果から、1% TrironX-100 に不溶性、低密度である DIGs 画分に AK97 に反応する糖脂質および糖タンパクが局在していることがわかった。この膜領域は脂質ラフトと呼ばれることが多く、糖脂質によって活性調節されるシグナル伝達分子の存在も知られている。このことから寄生条虫に存在する糖脂質 SEGLx および同様の糖鎖も持ったタンパク質が結合することで、糖脂質マイクロドメインの機能に何らかの影響

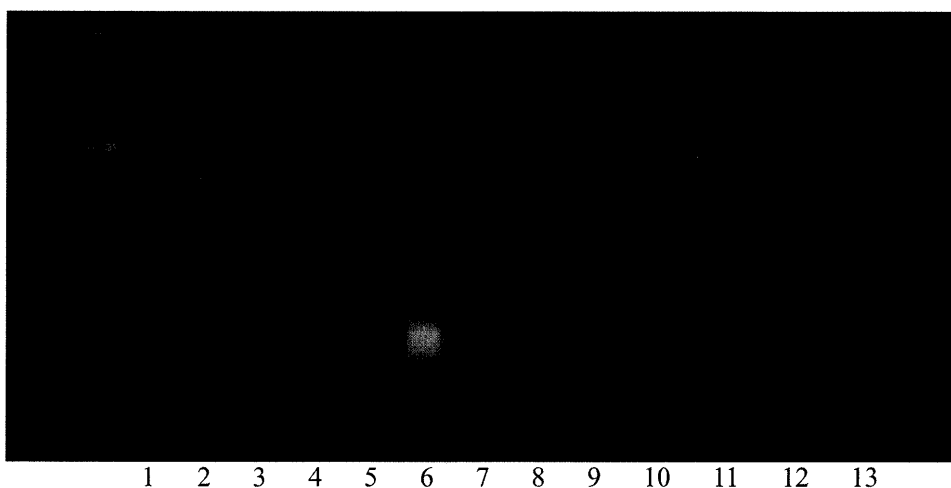


Fig. 1 Distribution of *S. erinaceieuropaei* proteins on sucrose density Centrifugation gradients using AK97.

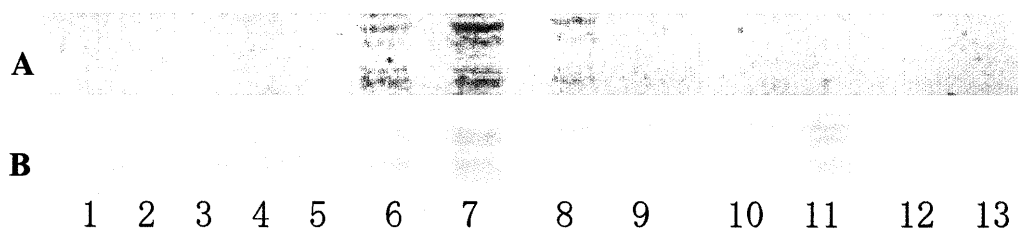


Fig. 2 Distribution of *S. erinaceieuropaei* glycolipids on sucrose density centrifugation gradients using orcinol (A) and AK97 (B).

を及ぼしていることが考えられた。

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。

#### 4. 要約

条虫から、生体膜上で集合してできると考えられている微小膜領域である膜ミクロドメインを調製し、糖脂質およびタンパク質糖鎖について実験を行った

結果、低密度である DIGs 画分に AK97 に反応する糖脂質および糖タンパクが局在していることがわかった。インフルエンザウイルスやヒト免疫不全ウイルス (HIV) の感染には糖鎖が重要な役割を担うことが知られており、糖鎖は条虫類の感染にも深く関与している可能性は極めて高く、固有宿主と非固有宿主を識別する因子として糖脂質や糖タンパク質のさらなる実験が必要であると考えられた。

#### 文献

- 1) Singh BN, Lucas JJ, Beach DH, Costello CE: J. Biol. Chem., 269, 21972-21982 (1994)
- 2) Murphy SC, Samuel BU, Harrison T, Speicher KD, Speicher DW, Reid ME, Prohaska R, Low PS, Tanner MJ, Mohandas N, Haldar K: Blood, 103, 1920-1928 (2004)
- 3) Racoosin EL, Davies SJ, Pearce EJ: Mol Biochem Parasitol, 104, 285-297 (1999)
- 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)