

条虫類に存在する糖脂質の化学構造解析

Chemical structures 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. 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.

In this study, GSLs were purified from larvae and adults of the tapeworms, *Spirometra erinaceieuropaei*, and their chemical structures were determined. Total lipid fractions prepared from chloroform/methanol extracts of whole tissues were fractionated successively on ion-exchange chromatography, silicic acid column chromatography, and preparative TLC. The purified GSLs characterized by TLC-immunostaining, permethylation analysis, MALDI-TOF/MS.

The GSLs Gal1-4Glc1-3(Gal1-6)Gal1-Cer was found in adult worms but not in larvae. These findings suggested that GSL compositions were significantly different between adults and larvae.

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糖脂質に着目し、その化学組成・構造解析を行い寄生現象と寄生虫糖脂質との関わりについて解明することを目的として実験を行った。ヒトに感染性のある条虫類は、分類学上、擬葉目条虫類と円葉目条虫類に分類される。我々は擬葉目条虫に特有の糖脂質（スピロメト系列糖脂質）を発見しており、マンソン裂頭条虫 [1, 2], 日本海裂頭条虫 [3], 堀田裂頭条虫 [4] いずれの擬葉目条虫にも、この糖鎖系列に属する糖脂質が存在することを報告してきた。最近マンソン裂頭条虫の幼虫（プレロセルコイド）とイヌから得られた同条虫の成虫で、この糖脂質の発現に違いがあることを予備実験により見出した。今回は宿主の違いと糖脂質糖鎖

の発現について着目し、ネコ由来のマンソン裂頭条虫の成虫について同様の実験を行い、条虫の発育の違いによる糖脂質の発現の差異や糖脂質分子種が同一の条虫でも寄生する宿主によって異なるのかについて検討した。

2. 方法

実験には、マンソン裂頭条虫のプレロセルコイドをネコに感染させて得られた虫体を用いた。虫体を20倍量のクロロホルム-メタノール混液（2:1, v/v）およびクロロホルム-メタノール-水混液（1:1:0.1, v/v/v）でホモジナイズし総脂質を得た。次にDEAE-トヨパール（Tosoh, Japan）イオン交換クロマトグラフィーを行い中性脂質と酸性脂質にグループ分けを行った。得られた中性糖脂質をケイ酸カラムクロマトグラフィーを行い、クロロホルム-メタノール混液

(98:2, v/v) からクロロホルム-メタノール-水混液 (40:58:2, v/v/v) の連続濃度勾配溶出により単離した。

薄層プレートはHPTLC Silica gel 60, 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。

TLC-immunostaining は以下のように行った。TLC を展開して風乾後, 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した。真空デシケーター内で5分間乾固した後, 5% BSA (ウシ血清アルブミン) 溶液に浸し, 1時間室温でブロッキングを行った。その後湿箱内にて一次抗体で2時間反応させた。0.05%ツウイン20含有PBS (リン酸緩衝生理食塩水) 溶液で余分な一次抗体を洗い流した後再度風乾し, 二次抗体で30分間室温で反応させた。抗体をPBSで洗い流し発色試薬を用いて発色させた。

一次抗体として用いたAK97はスピロメト系列糖脂質の非還元末端の3糖 [Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) Glc] を認識するマウスモノクローナル抗体である [5]。HRP標識二次抗体はヒストファインシンプルステインMAX-PO, 抗体希釈溶媒には1% BSA含有PBS溶液, 発色試薬にはコニカイムノステインHRP-1000を用いた。

糖脂質の構成成分の分析にはガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS), 分子量はマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF/MS) を用いて分析を行った。ま

た, 糖鎖構造については部分メチル化アルジトールアセテート誘導体のGC/MS分析を行って糖の結合位置を推定した。

3. 結果と考察

Fig. 1のTLCの写真に矢印で示したように, オルシノールで染まっている糖脂質のバンドの中に, AK97では染色されないバンドが成虫のみに見つかった。このことからスピロメト系列糖脂質とは糖鎖構造の異なった糖脂質が成虫に発現していることが示唆された。そこでFig. 2のように, そのバンドを単離して, 同様にオルシノールおよびAK97による染色を行ったところ, 画分50, 51としてこの成虫特異的なバンドを単離することができた。そこで両画分の糖鎖構造を確認するため, 部分メチル化アルジトールアセテート誘導体のGC/MS分析を行って糖の結合位置を推定した。その結果, Fig. 3に示すようなピークが得られ, この結果からGal1-4Glc1-3 (Gal1-6) Gal1-Cerの糖鎖構造が推定された。さらに分子量を確認するため, 画分51の糖脂質についてMALDI-TOF/MS分析を行った結果, 検出された分子イオン

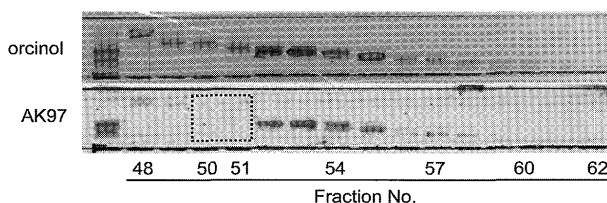


Fig. 2 TLC of isolated glycolipids from adult worms

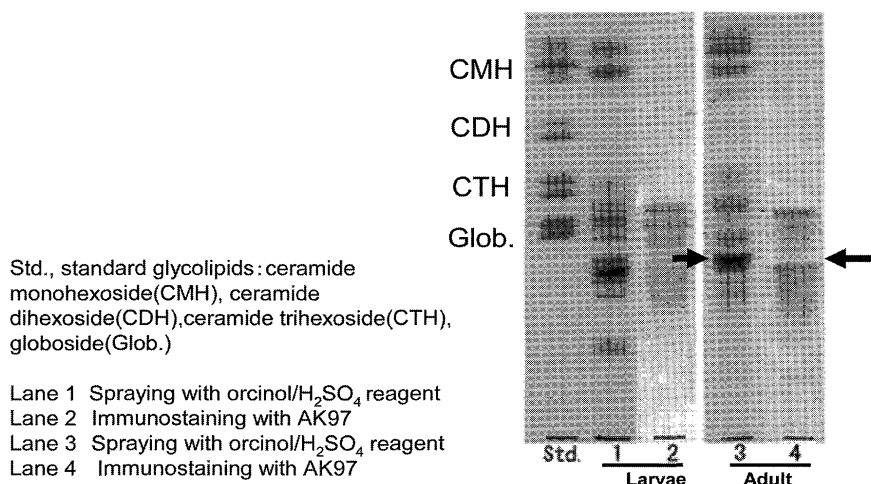


Fig. 1 TLC of glycolipids from larvae and adult of *Spirometra erinaceieuropaei*

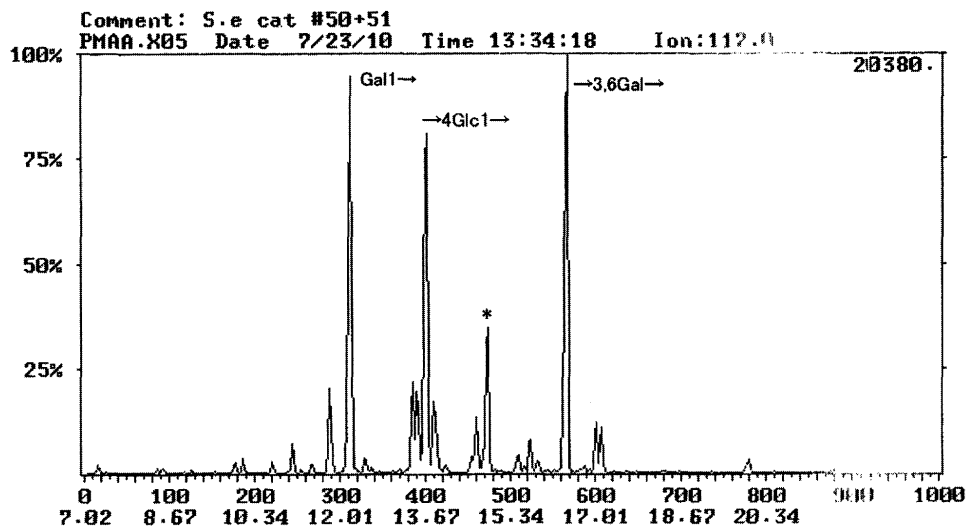


Fig. 3 GLC of partially methylated alditol acetates derived from glycolipids.

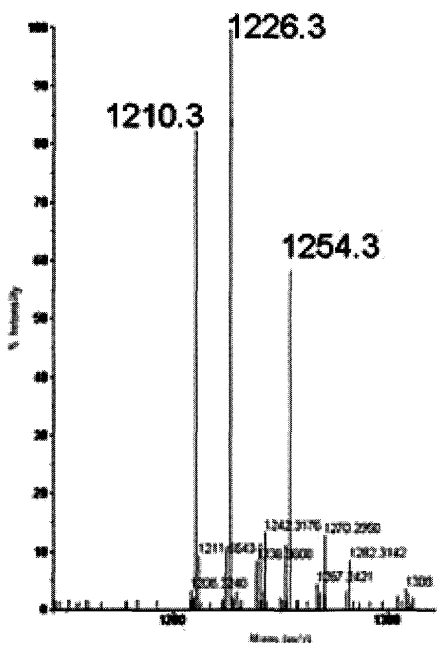


Fig. 4 MALDI-TOFMS analysis of glycolipids from adult worms.

1210, 1226, 1254 は、ヘキソース4個で、セラミド組成（脂肪酸と長鎖塩基の組み合わせ）が、おのおの C16:0-d18:0, C16h:0-d18:0, C18h:0-d18:0 であることがわかった。このことから画分 51 の糖脂質はヘキソース4糖からなる糖脂質で、スピロメト系列糖脂質とは異なった構造であることがわかった。

これまで Manson 裂頭条虫から得られた糖脂質は、基本骨格がスピロメト系列であることは周知の事実であったが、詳細に検討を加えた結果、成虫にのみ

特異的に発現している糖脂質が存在することがわかった。今回はネコから得られた成虫を実験に用いたが、我々は、イヌから得られた虫体を用いて予備実験から同様の知見を得ていることから、Manson 裂頭条虫では幼虫と成虫で糖脂質の発現が異なっていることがわかった。しかし宿主動物がイヌ、ネコであってもその違いは見出すことができなかった。今後はさらなる糖脂質の構造解析を進め、糖脂質の発現と宿主認識の機構についても解析を行う予定である。

4. 要約

ネコ由来の Manson 裂頭条虫成虫から、4糖からなる糖脂質を単離・精製し、MALDI-TOF/MS により分析した結果、糖組成はヘキソースが4つという結果であった。この結果は、イヌ由来の成虫を用いた分析結果と一致し、成虫特異的であった。すなわち幼虫と成虫に存在するスピロメトシドがフコースを含むのに対し、成虫でのみフコースを含まないヘキソース4糖からなる成分が発現することになる。このことから、幼虫から成虫に発育することにより、存在する糖脂質が一部変化していることがわかった。しかしながら宿主の違いによる糖脂質の変異は認められなかった。

文献

[1] Kawakami Y, Nakamura K, Kojima H, Suzuki M,

- Inagaki F, Suzuki A, Sonoki S, Uchida A, Murata Y, Tamai Y: *J Biochem*, 114, 677-683 (1993)
- [2] 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)
- [3] Iriko H, Nakamura K, Kojima H, Naoko LT, Takeshi K, Kawakami Y, Ineo I, Uchida A, Murata Y, Tamai Y: *Eur J Biochem*, 269, 3549- 3559 (2002)
- [4] 川上 泰, 柳澤 亮: *北里医学*, 28, 25-33 (1998)
- [5] Yanagisawa M, Kojima H, Kawakami Y, Iriko H, Nakamura T, Nakamura N, Uchida A, Murata Y, Tamai Y: *Mol Biochem Parasitol*, 102, 225-235 (1999)