

Entamoeba histolytica galactose/N-acetylgalactosamine 特異的レクチン heavy subunit 遺伝子完全長の単離と組換え蛋白質の作製

○脇 紀彦¹, 竹内 英之¹, 宇佐美 克明¹, 吉田 理人¹, 野崎 智義², 入村 達郎¹
(¹東大院薬, ²群馬大院医)

【目的】 *Entamoeba histolytica* はアメーバ赤痢の原因となる感染性原虫であり、細胞表面に galactose (Gal)/N-acetylgalactosamine (GalNAc) 特異的レクチンを発現しその heavy subunit (HGL) によってヒト大腸上皮に結合する。 *E. histolytica* が宿主上皮細胞を破壊する上でこの結合は必須であるため、HGL は感染防御薬の標的分子である。しかし HGL 完全長が Gal/GalNAc 結合活性のある組換え蛋白質として大量に獲得された例はなかった。そこで HGL 遺伝子完全長の単離と組換え蛋白質の作製を行った。

【方法】 *E. histolytica* HM-1:IMSS cDNA を鋳型とした PCR 法により HGL2 遺伝子完全長を単離し 3' 末に V5 タグ、His タグ配列を付加し pFastBac1 に挿入した。Bac-to-Bac 法によりバクミドを作製し Sf9 細胞へ導入しウイルス増幅を 2 回もしくは 3 回行った。ウイルス感染細胞を 0.1% NP-40 で可溶化し抗 V5 タグ、抗 His タグ抗体での Western blot により組換え蛋白質の発現を検出した。Gal-Sepharose、GalNAc-agarose で組換え蛋白質の糖鎖結合性を調べた。

【結果および考察】 PCR 法により 3861 bp の HGL2 cDNA を単離した。2 回および 3 回の増幅を経たウイルスに感染した細胞可溶化物に HGL2 が検出された。検出された HGL2 の分子量は約 170 kDa で一次構造から推定される 144 kDa と異なるものであった。検出されたバンド強度から蛋白質量を概算したところ、細胞可溶化物中の全蛋白質に HGL2 が占める割合は 2 回の増幅で約 1/20000、3 回の増幅で約 1/1000 であった (1 l の培養系から 200 μ g)。3 回増幅したウイルスによる HGL2 は Gal/GalNAc 特異的結合活性を有していた。HGL2 を精製し *E. histolytica* の感染を抑制する分子の同定に利用する予定である。