

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390119  
 研究課題名 (和文) 睡眠病トリパノソーマのステージ特異的 GPI アンカー生合成機構に関する研究  
 研究課題名 (英文) Stage specific modifications of GPI anchor in Trypanosoma brucei  
 研究代表者 木下 タロウ (KINOSHITA TAROH)  
 大阪大学・微生物病研究所・教授  
 研究者番号：10153165

## 研究成果の概要：

睡眠病トリパノソーマの細胞表面の主要タンパク質が GPI アンカー型タンパク質である。プロサイクリック型原虫の GPI アンカーは、糖鎖にポリラクトサミンの側鎖が結合していること、さらにその側鎖に宿主由来のシアル酸が付加されていることに特徴がある。トリパノソーマはシアル酸を合成することができないが、トランスシアリダーゼによって宿主成分から転移される。従来トランスシアリダーゼとして1つのタンパク質が同定されていた。我々は、トランスシアリダーゼ活性を持つ第2のタンパク質 TS270b を同定した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：寄生虫学 (含衛生動物学)

キーワード：原虫、トリパノソーマ、睡眠病、GPI アンカー、シアル酸

## 1. 研究開始当初の背景

GPI アンカーは、真核生物で広く用いられるタンパク質の膜結合様式であり、特に原虫においては細胞表面の主要タンパク質の多くが GPI アンカー型タンパク質である。GPI アンカーは、宿主側においても 100 種類以上の細胞表面タンパク

質に用いられ、その中には生体防御に関わるタンパク質も多い。私たちは、宿主側の GPI アンカー型タンパク質の生合成経路の研究を 10 年以上にわたって行い、GPI の生合成とタンパク質への付加、さらに付加後に起こるリモデリングに関わる 20 数遺伝子を世界に先駆けてクロー

ニングし、それらの機能を明らかにしてきた。宿主側の研究で蓄積した知見を基に、数年前から睡眠病トリパノソーマの GPI アンカー型タンパク質の生合成経路の研究を開始した。

睡眠病トリパノソーマはサハラ砂漠以南の 36 カ国に分布し、年間少なくとも数十万人の睡眠病患者が発生し、医学的に大きな問題である。また、家畜の生産性や繁殖力を著しく低下させることから農業経済的にも深刻な問題である。主要表面抗原である Variant Surface Glycoprotein (VSG) の抗原変異によって免疫を回避することからワクチンの開発はきわめて困難であると考えられ、抗トリパノソーマ薬の開発が重要である。現在の抗トリパノソーマ薬は副作用が強く、また神経症状が現れた後には有効でないことから、より安全で効果的な薬剤の開発が必要である。そのためにも、新しい薬剤の標的を確立することが重要である。

睡眠病トリパノソーマの血流型原虫の表面をコートしている VSG は、GPI アンカー型タンパク質であり、プロサイクリック型原虫の主要表面タンパク質であるプロサイクリンも GPI アンカー型である。VSG は細胞あたり  $10^7$  分子と大量に存在し、その生合成活性も高いことから、GPI アンカーの化学構造の決定と生合成ステップの概略の決定は血流型トリパノソーマを用いて行われた。しかし、GPI アンカーを欠損した突然変異体の確立ができなかったことから、生合成に働く遺伝子群の解明はトリパノソーマを用いては進展しなかった。一方、哺乳動物細胞では、GPI アンカー型タンパク質が細胞レベルでは必須でなく、CHO 細胞などから多くの GPI アンカー欠損変異株を確立することが可能で、それらを用いた発現クローニング法によって次々と生合成遺伝子がクローニングされた。その後トリパノソーマのゲノムプロジェクトが進展し、多くの遺伝子情報が得られるようになり、哺乳動物遺伝子のホモログを調べることにより、生合成遺伝子が得られるようになった。

私たちは、睡眠病トリパノソーマの GPI

アンカー生合成に必要な遺伝子である TbGPI10 を初めてクローニングし、遺伝子破壊することにより、GPI アンカー生合成が血流型原虫の生存に必須であること、すなわち GPI アンカー生合成経路が抗トリパノソーマ薬開発の標的になることを示した。一方、プロサイクリック型原虫では、GPI アンカーがなくともフラスコ内では増殖できるが、ツェツェ蠅中腸内での生存には、GPI アンカー型酵素であるトランスシアリダーゼによる宿主からのシアル酸の獲得が必須であることを示した。血流型原虫では、表面を覆っている VSG のコートができないと、おそらく細胞が脆弱になり、フラスコ内でさえ生存できないと考えられる。プロサイクリック型原虫では、プロサイクリンは細胞の保持には必要でないが、GPI がシアル酸によって修飾され、グリコカリックスを形成することがツェツェ蠅中腸内での生存に不可欠であると考えられる。

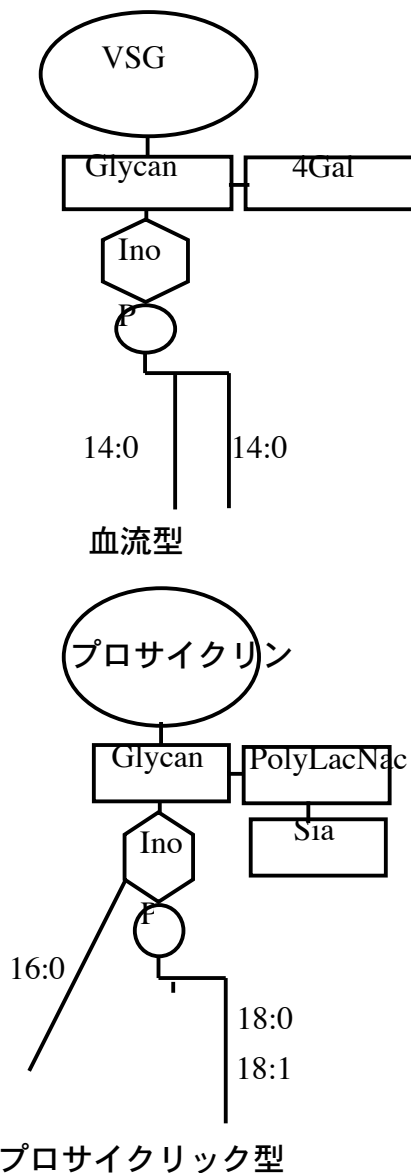
## 2. 研究の目的

GPI アンカーの構造は、血流型とプロサイクリック型原虫で大きく異なっている (図 1)。血流型原虫の GPI は、ホスファチジルイノシトール (PI) 部分に 2 本のミリスチン酸を持ち、糖鎖部分に複数のガラクトースからなる側鎖を持っている。2 本のミリスチン酸は GPI が VSG に付加される前に、脂肪酸リモデリング反応によって元のより長い脂肪酸と入れ替わることが知られている。この脂肪酸リモデリングは、血流型トリパノソーマに特異的な現象で宿主には存在しないので、原虫の GPI アンカーを選択的に阻害するのに好都合である。本研究の第 1 の目的は、脂肪酸リモデリングに関わる酵素群を明らかにすることである。

一方、プロサイクリック型原虫の GPI アンカーは、PI 部分はリゾ体であり、イノシトールにパルミチン酸が結合していること、糖鎖にポリラクタサミンの側鎖が結合していること、さらにその側鎖に宿主由来のシアル酸が付加されていることに特徴がある。この構造の形成を阻害することができれば、ツェツェ蠅内での原虫の増殖を阻害することができる。ヒ

トからヒト、家畜から家畜への伝播には、ベクター中腸内での分化と増殖が必須なので、それを阻害する薬剤は、伝播阻止薬となる可能性がある。本研究の第2の目的は、プロサイクリック型特異的なGPIの構造が形成されるメカニズムを明らかにすることである。

この2つの目的が達成されると、抗トリパノソーマ薬開発の新規標的が確立され、アフリカトリパノソーマ症制圧に資する。



(図1) 血流型とプロサイクリック型原虫のGPIアンカーの構造の違い

### 3. 研究の方法

#### (1) 血流型原虫 GPI アンカーの脂肪酸

リモデリングに関わるタンパク質/遺伝子群の解明。

血流型原虫においては、VSGへの付加の前にGPIの2本の脂肪酸が炭素数14の飽和脂肪酸であるミリスチン酸に置き換えられる。この脂肪酸リモデリングは、イノシトール環にも脂肪酸がついた3本鎖の糖脂質から反応が始まり、ミリスチン酸2本を持つ完成型の糖脂質に至るまでに5段階の酵素反応を要する。私たちと他のグループの最近の研究で、哺乳動物細胞と出芽酵母において、タンパク質に付加後のGPIアンカーのsn2位の脂肪酸が置き換わるリモデリングが存在することがわかり、それに働く遺伝子が明らかになった。Sn2位の脂肪酸の入れ替えは、トリパノソーマの反応に相当しているため、哺乳動物と酵母の配列情報を基に、トリパノソーマの機能ホモログを同定する。具体的には、酵母においてsn2位への脂肪酸付加反応に働いていることが示されたGUP1に似たトリパノソーマの遺伝子2個がゲノム情報から見つかったので、これら(TbGUP1, TbGUP2)のノックダウンを行う。必須遺伝子である可能性を考慮し、RNAiはドキシサイクリンで誘導できる系を用いる。RNAi誘導後に膜面分を調製し、脂肪酸リモデリング反応を行う。GUP1はアシル転移酵素のモチーフを持つので、TbGUP1とTbGUP2も酵素であると予想される。RNAiの結果、中間体が蓄積するか調べ、リモデリングに働く遺伝子であるかを決定する。

(2) プロサイクリック型特異的GPI構造の形成メカニズムと意義。

プロサイクリック型特異的GPIの特徴の一つは、ポリラクトサミン側鎖に複数のシアル酸が付加されることである。シアル酸は、トランスシアリダーゼによって宿主成分から転移されるが、従来トランスシアリダーゼとして1つのタンパク質が同定されている。このタンパク質が酵素活性を有していることは我々も確かめているが、トリパノソーマゲノムにはさらに7個の似た遺伝子が存在するので、これらをクローニングし、発現させたタ

ンパク質に酵素活性があるか調べる。具体的には、トランスシアリダーゼが細胞内で分解され発現されないことが知られている（すなわち、原虫表面にシアル酸が全く付加されない）TbGPI8 遺伝子ノックアウト原虫に、各アイソフォームを分泌型にすることによって発現させ、培養上清からシアル酸付加を行わせる。

#### 4. 研究成果

(1) 血流型原虫 GPI アンカーの脂肪酸リモデリングに関わるタンパク質／遺伝子群の解明。

TbGUP1 をノックダウンし、GPI 生合成を解析したところ、リゾ体である中間体の蓄積が認められた。この事から、TbGUP1 は sn2 位ヘミリスチン酸を付加するのに働く酵素であることが示唆された。

(2) プロサイクリック型特異的 GPI 構造の形成メカニズムと意義。

トリパノソーマゲノムに存在する 7 個のトランスシアリダーゼ様遺伝子をクローニングし、発現させたタンパク質に酵素活性があるか調べた。その結果、4 つのアイソフォームを発現させることができ、そのうちの一つである TS270b にトランスシアリダーゼ活性を確認した。従来活性が知られている TSB38p と TS270b は、どちらも供与体基質としてアルファ 2-3 結合のシアリルラクトースを利用したが、アルファ 2-6 結合のシアリルラクトースは利用できなかった。生成物は、どちらもアルファ 2-3 結合であった。あとの 3 つには活性が検出できなかった。以上のことから、睡眠病トリパノソーマは、少なくとも 2 種のトランスシアリダーゼを持っていることがわかった。

また、トランスシアリダーゼ活性を発現しないプロサイクリック原虫変異株に可溶性 TS270b を発現させると、原虫表面にシアル酸が付加されたので、実際に原虫表面のシアル酸化に寄与している酵素で

あることが確かめられた。

#### 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 1 件)

Kinoshita, T. 2008. Designing sleeping sickness control. *ACS Chem. Biol.*, 3, 601-603.

査読有り

[図書] (計 1 件)

Ferguson, M., T. Kinoshita and G. Hart. 2008. Glycosylphosphatidylinositol anchors. In *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. Ed. Varki, A.; Cummings, R.D.; Esko, J.D.; Freeze, H.H.; Stanley, P.; Bertozzi, C.R.; Hart, G.W.; Etzler, M.E., p143-161. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[その他]

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

木下 タロウ (KINOSHITA TAROH)  
大阪大学・微生物病研究所・教授  
研究者番号： 10153165

##### (2) 研究分担者

前田 裕輔 (MAEDA YUSUKE)  
大阪大学・微生物病研究所・准教授  
研究者番号： 00294124

森田 康裕 (MORITA YASUHIYO)  
大阪大学・微生物病研究所・特任助教  
研究者番号： 70397769

##### (3) 連携研究者