

【引用文献】

- 1) R. Saijo, Y. Hagimoto, M. Kawase, New Synthesis of 3-Trifluoromethylpyrroles by Condensation of Mesoionic 4-Trifluoroacetyl-1,3-oxazolium-5-olates with Phosphorus-ylides. *Org. Lett.*, 12, 4776 (2010).
- 2) R. Saijo, M. Kawase, The Use of Sulfur Ylides in the Synthesis of 3-Alkyl (aryl) thio-4-trifluoromethylpyrroles from Mesoionic 4-Trifluoroacetyl-1,3-oxazolium-5-olates. *Tetrahedron Lett.*, 53, 2782 (2012).
- 3) 特集 フッ素化学の最前線, ファルマシア, 50 巻1号 (2014).
- 4) E. S. Istvan, J. Deisenhofer, Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science*, 292, 1160 (2001).



アフリカトリパノソーマ原虫の糖転移酵素 TbGT8 は、N- 結合型糖鎖と GPI アンカー修飾型糖鎖の 両方の合成に関わる二機能性酵素である

松山大学薬学部生化学研究室 中西 雅之

【はじめに】

当研究室では生化学的・分子生物学的アプローチで、トリパノソーマ原虫のバイオロジーを解明し、そこから見い出される弱点を狙って抗トリパノソーマ薬の開発を進めようとしている。トリパノソーマ原虫は実験室で純粋培養でき、遺伝子改変や RNA サイレncing のためのツールが揃っているため、種々の実験的アプローチが可能である。なお、「原虫」とは単細胞の寄生性真核生物のことを指し、マラリアの原因となるマラリア原虫やトキソプラズマ症の原因となるトキソプラズマ原虫などが有名であるが、本研究ではアフリカ睡眠病の原因となるアフリカトリパノソーマ原虫 (*Trypanosoma brucei*) を対象としている。トリパノソーマ属の原虫には、*T. cruzi*, *T. evansi*, *T. congolense*, *T. vivax* など多くの種があり、それぞれ異なる寄生虫症の原因となるが、本稿では *T. brucei* のみをトリパノソーマ原虫と呼ぶことにする。

トリパノソーマ原虫は、血を吸うハエであるツエツエバエと哺乳類動物（ヒト、ウシなど）の両者を宿主として生存している（図 1）。この原虫が原因となるアフリカ睡眠病は次のような経過を辿る：トリパノソーマ原虫に寄生されたツエツエバエに刺されると、発熱や頭痛を繰り返し、頸部リンパ節が腫れてくる（第 1 ステージ）。この段階でアフリカ睡眠病との診断がつけば治療が可能であるが、このような症状を引き起こす病気は多く、見過ごされ易い。やがて原虫が脊髄液中に移行して増殖し始め、睡眠障害や激しい痙攣などの神経症状を招く第 2 ステージに至り、昏睡状態を経て死亡する。第 2 ステージではメラルソプロールやエフロルニチンが治療薬となるが、前者はヒ素を含む薬剤であることから毒性が極めて高く、患者の 10% が重症の脳炎を起こし、そ

の半数が薬の副作用で死亡する¹⁾。後者は比較的安全であるが、東アフリカのアフリカ睡眠病には効果がなく、また西アフリカでも耐性原虫の出現が懸念される。

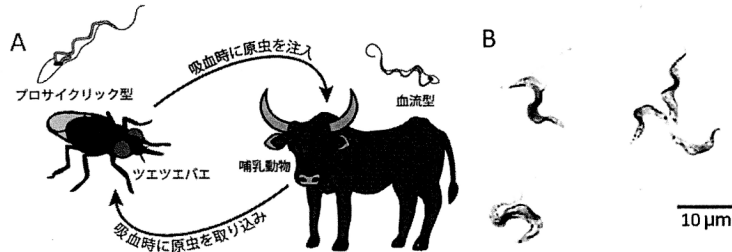


図 1. トリパノソーマ原虫のライフサイクル(A)と血流型原虫のライトギムザ染色像(B)。ツエツエバエに寄生したトリパノソーマ原虫は、吸血の際に唾液とともに放出されて哺乳類宿主の体内に侵入し、血流型原虫となって分裂増殖する。血流型原虫は、ツエツエバエが哺乳類動物の血液を吸う際、血液と一緒に取り込まれ、ツエツエバエの消化管内で分化してプロサイクリック型となり、ここでも分裂増殖する。トリパノソーマ原虫はこのサイクルを繰り返すことで種を存続させる。

アフリカ睡眠病は日本には存在せず、サハラ砂漠以南の緑豊かな地域にのみ存在する。従って、日本の医療現場で、アフリカ睡眠病の患者に遭遇する可能性は極めて低い、となると本会誌の読者諸氏は一気に興味を失うかもしれない。まさにこの点が「顧みられない熱帯病 (neglected tropical diseases)」の所以である。身近にない、また経済的に利益を生まない病気には製薬企業の動きも鈍い。その是非はさておき、本稿にしばしお付き合いいただければ幸いです。

アフリカ睡眠病には、予防や治療のためのワクチンも存在しない。トリパノソーマ原虫の表面は VSG (variant surface glycoprotein) と呼ばれる糖タンパク質で密に覆われており、宿主の補体成分の接近を妨げている。VSG に対しては獲得免疫が成立するが、トリパノソーマ原虫は別の VSG を発現させることで (= 抗原性を変化させることで)、排除を免れる。トリパノソーマ原虫のゲノムには約 1000 種類の VSG 遺伝子が存在し、それらが次々に入れ替わって発現するために宿主の免疫システムは、血流中で増殖するこの原虫を排除できない。

本論文では、トリパノソーマ原虫のタンパク質を修飾する糖鎖に注目した。多細胞生物が作る糖鎖には、細胞間の識別や接着、細胞の保護、タンパク質の安定化などの機能があり、糖鎖の形成不全は胎生致死や先天的な疾病 (CDG: congenital disorders of glycosylation) を引き起こすが、単細胞生物であるトリパノソーマ原虫での糖鎖の存在理由は、現在のところ不明である。ただ、トリパノソーマ原虫は哺乳類と同様の複合型糖鎖で自身のタンパク質を修飾していることから、哺乳類宿主に寄生する上で糖鎖がなんらかの役割を果たすと推測される。

本論文ではトリパノソーマ原虫のゲノム解析から見出した 22 種類の糖転移酵素遺伝子のうち、10 番染色体に存在する遺伝子 (TbGT8 遺伝子, GeneID: Tb927.10.12290) を標的とした遺伝子ノックアウト株 (KO 株) を作製し、野生株と KO 株で表現型の違いを調べた。この *TbGT8* 遺伝子がプロサイクリック型原虫でグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーを修飾する糖鎖の合成に関与することは以前明らかにしたが、血流型原虫の GPI アンカーには相当する構造は存在しないことから、この遺伝子の機能は不明であった²⁾。

【TbGT8 遺伝子のノックアウトはトマトレクチンとの反応性を低下させる】

まず、トマトレクチンを用いたレクチンブロット解析により、KO 株では *N*-アセチルラクトサミン構造を含む糖鎖の量が低下していることを明らかにした。この糖鎖は PNGase F 処理により、ほぼ完全に消失することから、*N*-アセチルラクトサミン構造を含む糖鎖は、タンパク質を修飾する *N*-結合型糖鎖であることがわかった。そこで、界面活性剤で原虫の細胞膜を溶解して膜タンパク質を抽出し、そこからトマトレクチンと結合するタンパク質を精製した。これを野生株のものと比較したところ、KO 株では変性分子量約 110 kDa を示すタンパク質が消失していることが分かった (図 2)。

消失する 110 kDa タンパク質をタンデム質量分析で調べたところ、ここには酸性ホスファターゼ (AcP115)、p67 リソソーム/エンドソームタンパク、ESAG2 や HSP83 などのタンパク質が混在していることが判明した。中でも AcP115 はその計算分子量 43.7 kDa に対し、SDS-PAGE での分子量が約 110 kDa とその差が大きいことから、高度に糖鎖修飾を受けていると考えられたため、以後、このタンパク質について解析を進めることとした。

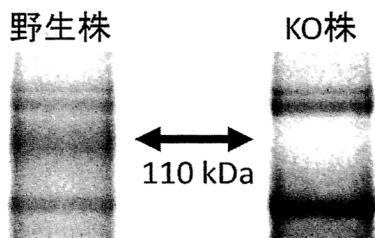


図 2. 野生株と TbGT8 遺伝子 KO 株。野生株および KO 株の溶解液から、固相化トマトレクチンを用いて糖タンパク質を回収後、SDS-PAGE で分離した。野生株に見られる 110 kDa のタンパク質が、KO 株では消失している。

【糖転移酵素 TbGT8 は、AcP115 を修飾する *N*-アセチルラクトサミン鎖の合成を部分的に担う】

AcP115 に対するポリクローナル抗体を作製し、ウエスタンブロット解析を行うと、KO 株の AcP115 は野生株のそれよりも 10 ~ 20kDa 小さいことが分かった。一方、AcP115 のポリペプチド部分の分子量には野生株と KO 株の間で差がないことから、この分子量差はポリペプチド以外の部分に起因することになる。さらに KO 株で発現する AcP115 は、トマトレクチンとの反応性も低下していることから、AcP115 の分子量低下は、修飾糖鎖の短縮に起因することが明らかとなった。糖鎖は、単糖の逐次的な転移反応で伸長する為、ある段階の転移反応が何らかの原因で止まると、その先の伸長反応は進行しない。これらのことを総合すると、TbGT8 は AcP115 を修飾する *N*-結合型糖鎖の *N*-アセチルラクトサミン構造の合成を全てではないが、部分的に担っていると考えられた。

【TbGT8 はゴルジ体に局在する】

一般的な動物細胞などでは、*N*-結合型糖鎖上の *N*-アセチルラクトサミン構造の合成はゴルジ体で進行する。これはトリパノソーマ原虫でも同じだろうか? この問いに答えるために、ゴルジ体タンパク質として知られる Golgi reassembly-stacking protein (GRASP) に対する抗体を作製し、免疫蛍光抗体法を用いてその局在を調べた。その結果、HA タグを付した TbGT8 は GRASP に重なって検出され、TbGT8 がゴルジ体に局在することが示された。すなわち、トリパノソーマ原虫は、動物細胞と同様にゴルジ体で *N*-アセチルラクトサミン構造の合成を行っていることが分かった。

以上より、糖転移酵素 TbGT8 は血流型とプロサイクリック型の両方で機能しているが、血流型では AcP115 を修飾する *N*-結合型糖鎖の合成を、プロサイクリック型では GPI アンカーを修飾する糖鎖の合成を担っていることが明らかになった。さらに、本酵素はゴルジ体に局在していることから、GPI アンカーの糖鎖修飾もゴルジ体で行われていることが判明した。

【おわりに】

最近、TbGT8 に相同な遺伝子、Tb927.3.5660 および Tb927.2.3370 の機能報告が相次いだ^{3, 4)}。今後も同様のアプローチをとることで、トリパノソーマ原虫の糖鎖合成経路の全容が解明されていくと期待される。なお、今回紹介した論文はオープンアクセスにしてあるため、特別なアクセス権不要で閲覧可能である (<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.01.007>)。ダウンロードして一読していただければ幸いです。

冒頭にも書いたが、ツエツエバエとトリパノソーマ原虫は、サハラ砂漠の南方に広がる緑豊かな地域に生息している。現在、サハラ砂漠の緑化事業が進められているが、その成功はアフリカ睡眠病の感染域拡大をもたらすことが予想される。トリパノソーマ原虫は家畜に感染しナガナと呼ばれる病気を引き起こすため、家畜の生産効率を下げ、食糧不足の原因にもなる。トリパノソーマ感染に対抗できる薬剤の開発は、これら問題への一つの解決になると期待している。

【引用文献】

- 1) Rodgers J., Human African trypanosomiasis, chemotherapy and CNS disease, *J. Neuroimmunol.* (2009) 211, 16-22
- 2) Izquierdo L, Nakanishi M, Mehlert A, Machray G, Barton GJ, Ferguson MA., Identification of a glycosylphosphatidylinositol anchor-modifying beta1-3 *N*-acetylglucosaminyl transferase in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* (2009) 71, 478-91
- 3) Damerow M, Rodrigues JA, Wu D, Güther ML, Mehlert A, Ferguson MA., Identification and functional characterization of a highly divergent *N*-acetylglucosaminyltransferase I (TbGnTI) in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* (2014) 289, 9328-39
- 4) Izquierdo L, Acosta-Serrano A, Mehlert A, Ferguson MA., Identification of a glycosylphosphatidylinositol anchor-modifying β 1-3 galactosyltransferase in *Trypanosoma brucei*. *Glycobiology* (2014) 本稿執筆時点では E-pub のみ