

総説

寄生性原生生物トリパノソーマおよびトキソプラズマの分子生物学的研究

～一研究者の研究生活の記録と若手研究者へのメッセージ～

永宗 喜三郎

Kisaburo Nagamune

国立感染症研究所 動物寄生部 〒162-0052 東京都新宿区戸山 1-23-1

筑波大学生命環境学系 〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

要旨

私の原生生物学研究は *Trypanosoma brucei* を用いた glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー生合成機構に関する研究と、*Toxoplasma gondii* における宿主細胞内侵入・増殖機序の解明に関する研究に大別できる。本総説ではそれらの分野の基礎となる分子細胞生物学的基盤について概観するとともに、それらの研究分野における著者の貢献について解説する。また同時に「ポストドクター等 1 万人支援計画」世代の先駆けのひとりとしての自分の経験についても回顧したい。

キーワード:

植物ホルモン, 糖脂質生合成経路, リアノジン受容体, *Trypanosoma brucei*, *Toxoplasma gondii*

はじめに

まず始めにこの度、原生生物学会賞をいただいたことに感謝を申し上げたい。受賞の記念に総説を書けというご指名をいただいたが、ただ無味乾燥な総説を書いても今さら若い皆さんの参考になるようなことも少ないかと思ったので、矢吹彬憲編集長と相談の上、自分の研究人生を振り返り、その当時若き研究者、永宗喜三郎は何を考えていたか、そしてどう考えて人生の岐路を選択したのかを含めて自分の研究を振り返ってみることとする。別に参考にさせていただくような模範的な研究生活を過ごしてきたわけではないが、若い研究者の進路を選択する上での一助となれば幸いである。電気泳動や酵素反応の待ち時間にコーヒーでも飲みながら、気楽に読んでいただきたい。

はじめの一步からトリパノソーマ研究へ

私の研究活動は、多くの人と同じく卒業研究から始まった。といっても、多くの人と異なり、生意気で自意識過剰であった私は指導教官と気が合わず、隣の研究室の助教授(当時の職階、以下同じ)の先生と酒を

飲むだけの日々を過ごした。そしてその助教授の先生との会話の中で私は「分子生物学」と出会った。分子生物学とは、言うまでもないが、「分子と分子(主にタンパク質同士)の相互作用によってすべての生命現象を記述しようとする」学問であり、この分子生物学的な考え方は、(1) 全く異なる場所で見られるよく似た生命現象には実はよく似た分子間相互作用が認められる、(2) 分子間相互作用は生物種を超えて共通である。つまり、ある生物で認められた分子間相互作用は別の種によく似た生命現象にも存在する、という方向へと発展していた。そしてこの「哲学」は、高校生物から獣医学へと学びを深めていってもなお、生物学とはいかに多くの生命現象についての知識を持っているかであるという博物学的生物学観を持っていた私にとって、非常にセンセーショナルなものであった。助教授の先生がボツリヌス菌の産生する毒素のひとつについての研究をしていたことから、彼のすすめに応じて、私は大阪大学微生物病研究所、細菌血清学部門の博士課程大学院生となり、コレラ菌や腸炎ビブリオの産生する細胞溶解毒素についての研究を始めた。コレラ菌の細胞溶解毒素は、いわゆるシグナルペプチドと毒素本体、そしてその間に挟まれたプロ領域の3つの領域からなる。プロ領域を含んだ状態の毒素は活性が低



Tel: 03-585-1111

E-mail: nagamune@niid.go.jp

Received: 30 Dec 2021; Accepted: 8 Feb 2022.

く、種々のプロテアーゼによりプロ領域は切断され成熟毒素となる (Nagamune et al., 1996) . 私は、この細胞溶解毒素のプロ領域が分子シャペロンの一種である HSP90 と相同性を有し、実際にプロ領域が毒素の立体構造の構築において「分子内シャペロン」として機能していることを明らかにできた (Nagamune et al., 1997).

大学院時代の研究はまさしく私にとって「分子生物学」であり、個人的には面白く実験を進めることができたが、どうも生物学的要素が足りないようにも感じていた。毒素はあくまでタンパク質であり生き物ではない。もう少し「生き物」の研究がしたいと思い、学位取得後の私は同じく微生物病研究所の免疫不全疾患研究分野でポストドクとしてのキャリアをスタートさせることにした。この研究室のボス、木下タロウ教授 (カタカナでタロウが本名) はもともと補体の研究者であった。補体はいわゆる自然免疫の一種で、外界から侵入してきた異物を非特異的に破壊する。そして補体系が自己と非自己の識別に使うのが補体制御因子であり、中でも CD59 と DAF (decay-accelerating factor, CD55) が有名である。一方で、この補体制御因子の機能不全として発作性夜間血色素尿症 (paroxysmal nocturnal hematuria, 以下 PNH) とよばれる病気が知られている。この病気は補体に対する耐性を失った造血幹細胞がクローン性に拡大し、特に赤血球が補体によって破壊される再生不良性貧血を主徴とする疾患である。なぜか夜間に赤血球が破壊され血尿を呈することからこの病名がつけられている。さらにこの主要な2種類の補体制御因子は実は glycosylphosphatidylinositol (GPI) という糖脂質によって細胞膜につなぎ止められていることが知られている。そして木下らのグループは PNH が GPI 生合成遺伝子のひとつである PIG-A 遺伝子の後天的な変異によることを見出したのである (Miyata et al., 1993; Takeda et al., 1993) . このように重要な機能を持つ GPI であるが、実は GPI の存在と構造は、原生生物であるブルーストリパノソーマ (*Trypanosoma brucei*, 以下トリパノソーマ) において発見、決定されたのである。トリパノソーマは variant surface glycoprotein (VSG) とよばれる表面抗原を変異させて宿主の免疫反応から逃れていることが知られているが、この VSG も GPI によって膜にアンカリングされていることが知られている (Borges et al., 2021) . トリパノソーマにおいて VSG は全産生タンパクのおよそ 1 割を占めているので GPI アンカー型タンパク質の特異的な動態に気づきやすく、また構造の決定や生合成経路の同定が行いやすく、トリパノソーマは GPI 研究のよいモデル生物であると考えられていた。また、さらに同じ寄生性原生生物のマラリア原虫も自身の表面を GPI アンカー型タンパク質で密接に覆っている。一例を挙げるとマラリア原虫がヒトに侵入するステージであるスポロゾイト期の原虫表面は circumsporozoite protein (CSP) で密に覆われており、このタンパク質は最近実用化されつつあるマラリアワクチン RTS, S の標的抗原である (Duffy P. E., 2022) . このように GPI はヒトにおいて

も原生生物においても非常に重要なタンパク質を細胞膜に繋留している。

前置きが長くなった。そのころ木下研では特定領域研究(A)「マラリア制圧の分子論的展開」の公募研究が当たり、マラリア原虫からトリパノソーマの GPI 生合成遺伝子を同定する人員を探していたそうだ。そこにちょうど学位を取得後に職がなくアルバイトで生計を立てていた私がおり、お声がかかったというわけだ。本来であれば、大学院生時代と同じくコレラ菌の研究でアメリカに留学する予定であったのだが、実はそちらの方はグラントの申請が失敗して予算のめどがつかずにご破算になっていたのだ。その結果として、希望していた「生き物」の研究ができるようになり、今につながっているのだから、当に「人間万事塞翁が馬」というやつだと改めて思う。

ところで私が学位を取ったこの時期は、「ポストドクター等 1 万人計画」や「大学院生 10 年間で倍增計画」といった政策の最初期に当たるわけで、私の前の先輩達はほぼ全員が出身ラボの助手になるか学術振興会 (通称学振) の特別研究員のポジションをゲットできるか、さもなくば職を求めて海外に留学するかのいずれかしかなかった時代であり、おそらく私は学振ではない国内ポストドクという経歴を持つほとんど最初の人間であるのではないかと考えている。こんな自分が見聞してきた「闘争の記録」をどこかに文章として残しておきたいと常日頃思っていたので、今回貴重な機会を頂けたことに感謝を申し上げたい。ただ私個人は個別の政策についての是非を意見する立場にはないので、そのあたりは学会の飲み会で若い人たちと語り合うことにしたいと思うに留めておく。いずれにしても、若い研究者の皆さん、別に私は自分が偉いと言うつもりは毛頭ないが、学位取得後半年以上フリーターをしていた私でも研究者人生を全うでき (そうにあ) るのだから、少しくらい職が決まらなくてもまったく気にすることはないですよ。

さて、木下研での研究内容は、既知のヒトや酵母の GPI 生合成遺伝子のアライメントから相同部分をピックアップし、そのアミノ酸配列を元に縮重プライマーを設計し、いわゆる“degenerate PCR 法”によってマラリア原虫からトリパノソーマの遺伝子を増幅させるという今ではなんてことのないプロジェクトなのであるが、その当時はかなりの熟練を必要とする職人技であり、職人としての経験を十分に積ませていただけた。その後、紆余曲折を経て、無事にトリパノソーマの PIG-B オーソログ、TbGPI10 の同定に成功し、さらにその遺伝子のノックアウトを試みることにより、ヒトの細胞レベルでは必須でない GPI 生合成経路が、血流型トリパノソーマにおいて必須であることを証明できた (Nagamune et al., 2000) . つまり、GPI 生合成経路は抗トリパノソーマ薬開発の非常にいい標的になり得ることを世界で初めて示唆できた。

ここで改めて、病原体としてのトリパノソーマについて述べておこう。ヒト・アフリカ・トリパノソーマ症は、サハラ以南のアフリカ大陸に蔓延している感染症で、アフリカ睡眠病、アフリカ眠り病などによれば

ている。その名の通り、感染末期に昏睡状態に陥った患者はまるで眠っているかのように意識を失ったまま命を落としていくのだ。トリパノソーマはマラリア原虫などとは異なり、宿主の細胞内に侵入せず血液中で鞭毛を用いて遊泳したまま活発に2分裂で増殖する。あまりに活発に増殖する結果、詳細な分子メカニズムはいまだ不明であるものの一部のトリパノソーマは血液脳関門を超えて脳脊髄液へと侵入し、中枢神経系で増殖を始めてしまい、その結果、患者は昏睡状態に陥る。トリパノソーマには3つの亜種があり、ガンビアトリパノソーマ (*Trypanosoma brucei gambiense*) は、ヒトおよび家畜、野生動物に感染し、ヒトへの感染は慢性の経緯を辿り、およそ数ヶ月～数年で中枢神経症状を呈する。サハラ以南のアフリカ西部～中部に分布する。それに対してローデシアトリパノソーマ (*Trypanosoma brucei rhodesiense*) はヒトに対して急性感染を引き起こし、およそ数週間～数ヶ月で中枢神経症状へと進行する。分布はアフリカ東部～南部である。これらに対して(狭義の)ブルーストリパノソーマ (*Trypanosoma brucei brucei*) はヒトへの感染は認められず、専ら家畜や野生動物にのみ感染する。このヒト感染の可否を決めている因子について多くの研究者が興味を持ち活発な研究が進められた。結果として、善玉コレステロールや悪玉コレステロールのうち善玉の方、high-density lipoprotein (HDL) の構成成分の一種であるtrypanosome lytic factor (TLF) が同定された。TLFの作用に対して耐性を持つガンビアおよびローデシアトリパノソーマのみがヒトへの感染を成立させることができるのである。TLFの分子組成や作用機構、そして耐性メカニズムなどについて現在ではかなり詳細に明らかとなっている(Stephens et al., 2012)。これら3亜種はすべてツェツェバエという吸血バエによって媒介される。また、私がトリパノソーマを研究していた頃は、アフリカ全土で年間数万～数十万のヒト・アフリカ・トリパノソーマ症が起きているとされていたが、最近では主にツェツェバエに対する対策が奏功し、年間数千件の発症に抑えられてきているようである。トリパノソーマに対するワクチンは存在せず、また治療薬も、特に中枢神経症状を発症した後は有効なものがほとんど存在せず、投薬による副作用での致死率が10%以上にも及ぶようなものであり、安価で安全な抗トリパノソーマ薬の開発が望まれている。

さてここで、ヒト及びいくつかの寄生性原生生物のGPIの構造(図1)と、ヒトとトリパノソーマの生合成経路(図2)を見てみよう。GPIは生物種を問わず非常によく保存された構造を取っていることが分かる(図1)。また、ヒトとトリパノソーマの生合成経路もよく保存されている(図2)。しかし両者の生合成経路間には明らかに異なっている点もある。そのうちのひとつが、完成したGPIをタンパク質に転移するトランスアミダーションのステップである。GPIはphosphatidylinositolに糖をひとつずつ付加して合成され、完成したGPIは、別個に合成されたタンパク質に翻訳後修飾のような形で転移される。GPI修飾を受ける前駆体タンパク質はGPI付加シグナル配列をC末端に

持っており、この配列がGPIトランスアミダーゼとよばれる酵素複合体によって切断され、切断点のオメガサイトとよばれるアミノ酸がGPIの先端に存在するエタノールアミンリン酸に転移される。このオメガサイト周囲のアミノ酸は「小さなアミノ酸」でないといけなことが経験的に知られているのであるが、どうもトリパノソーマでは比較的大きなアミノ酸も許容されるらしい(Eisenhaber et al., 1998)。そこで、「熟練の技術」で同定してきたトリパノソーマのGPIトランスアミダーゼのコンポーネントのひとつ、TbGPI8を用いて免疫沈降を行い、トランスアミダーゼ酵素複合体の組成を解析し、哺乳動物や酵母のものと比較した。その結果、トリパノソーマのGPIトランスアミダーゼは哺乳動物や酵母と共通な3つのコンポーネント(GPI8, GAA1, PIG-T)とトリパノソーマに特異的な2つのコンポーネント(trypanosomatid transamidase 1 (TTA1), TTA2)からなっていることをあきらかにできた(Ohishi et al., 2003; Nagamune et al., 2003; Hong et al., 2006a)。このことからGPIトランスアミダーゼは抗トリパノソーマ薬開発のよい標的となり得る可能性を示唆できた。一方、トリパノソーマGPIの構造は血流型とツェツェバエ腸管内型で異なっており、腸管内型のGPIはイノシトール部分がアシル化されているが、血流型のそれはアシル化されていないことが知られている(図2)。また哺乳動物のGPIは最終的には脱アシル化されているが生合成の途上のものはアシル化されている。このようにGPIのアシル基の有無は生物種やス

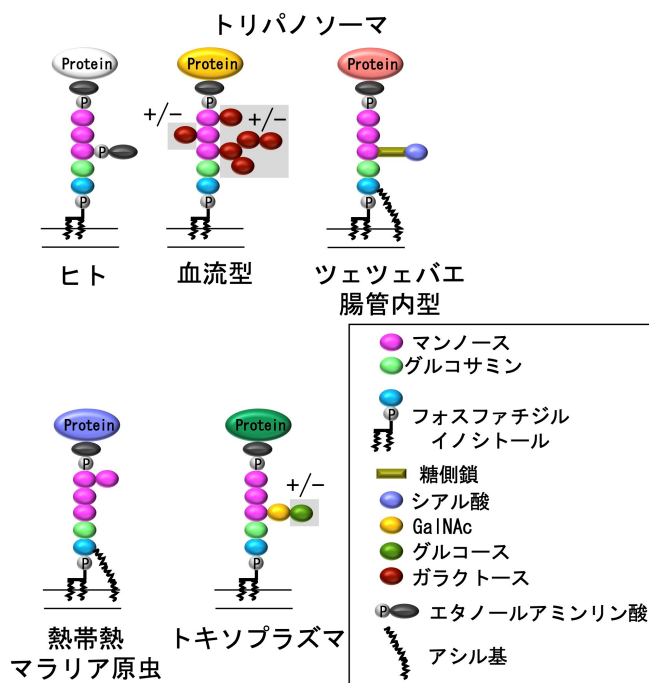


図1. ヒトおよび寄生性原生生物のGPIアンカーの構造とその生合成機構

ヒト、血流型トリパノソーマ、ツェツェバエ腸管内型トリパノソーマ、熱帯熱マラリア原虫、トキソプラズマのGPIの構造を示す。+/- は灰色の部分がある分子もない分子も存在することを示す。

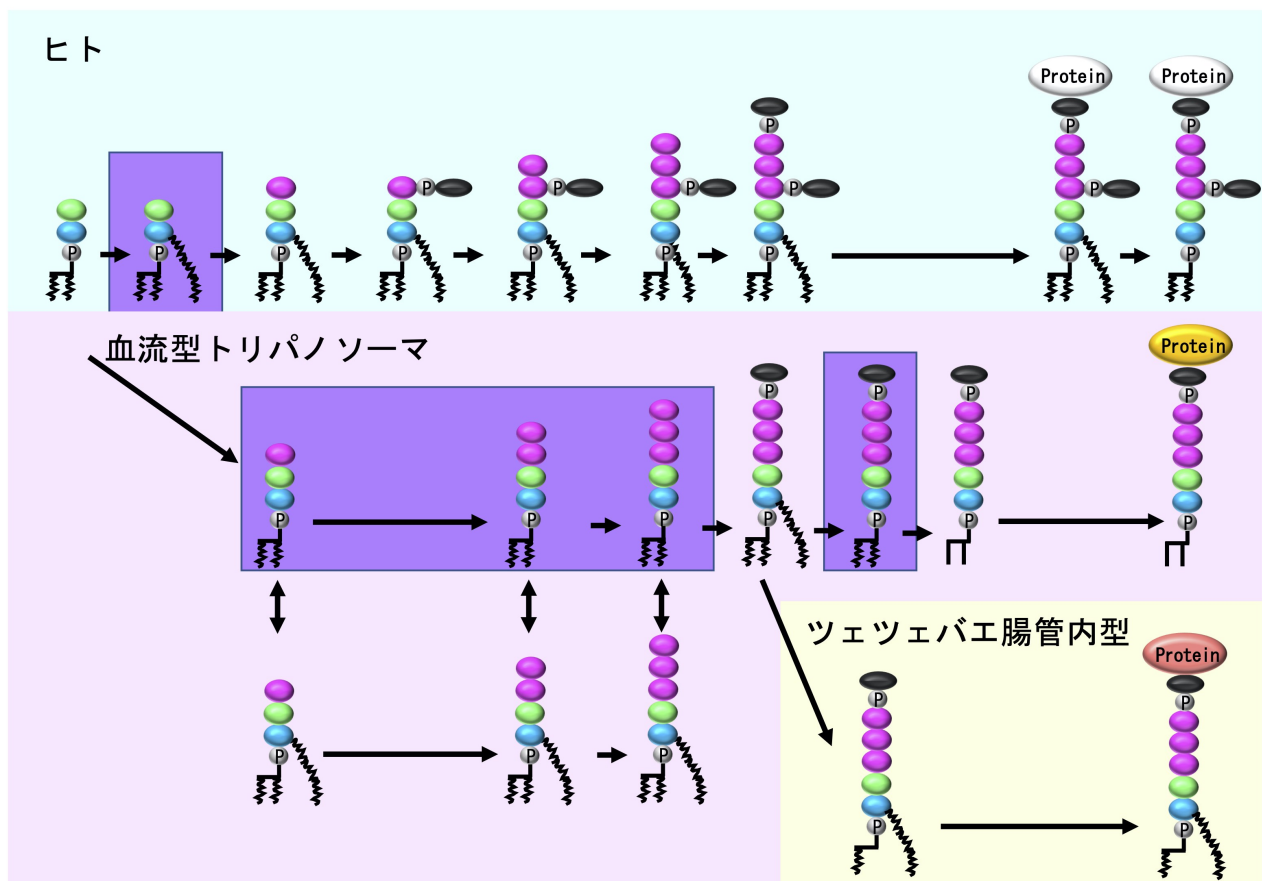


図 2. ヒト，血流型トリパノソーマ，ツェツェバエ腸管内型トリパノソーマの GPI アンカー生合成経路．血流型トリパノソーマの生合成経路にはアシル基を持つ中間体とアシル基を持たない中間体の両方が存在するのに対し，ヒトの経路はマンノースの付加が起こる前にアシル化され，その後トランスアミデーシオンによるタンパク質の付与後に初めて脱アシル化される．血流型トリパノソーマとヒトにおいて紫で示した構造はそれぞれの生物に特異的な中間体である．

テージによって厳密にコントロールされている．私はこの違いの原因となる GPI 脱アシル化酵素を同定し，この酵素遺伝子の発現がトリパノソーマの生活環の中で厳しく調節されており，その発現量を人為的に変化させることはトリパノソーマにとって致死的であることを示し，このイノシトールのアシル化酵素も抗トリパノソーマ薬開発の良い標的となり得ることを示唆できた (Hong et al., 2006b)．また，ツェツェバエ腸管内型トリパノソーマにおける主要な GPI アンカー型タンパク質の一つに，シアル酸を含む糖鎖からシアル酸を GPI に転移する酵素であるトランスシアリダーゼの存在が知られている．腸管内型トリパノソーマはシアル酸を合成することができないので，この酵素による宿主からのシアル酸転移反応は腸管内型トリパノソーマにとって唯一のシアル酸供給源となっている．私は腸管内型トリパノソーマのツェツェバエ中腸内での増殖に GPI のシアル酸による修飾が必須であることを見出した (Nagamune et al., 2004)．

このようなトリパノソーマを中心とした GPI アンカー生合成機構や GPI アンカー型タンパク質の機能解析を 8 年間続けた．その間に自分のポジションは，研究生か

ら生物系特定産業技術研究推進機構派遣研究員，任期付き助手，任期なし助手と変わっていった．このタイミングで私は留学をするのであるが，どうしてそういう行動に出たのか，今にして思うと，やはり昔ながらの，研究者は留学して一人前，みたいな固定観念はあったような気がする．また，木下研は助手が順番に留学していき，抜けたところに後任が入る，みたいな好循環があった．この循環のお陰で自分も助手になったのだから，次の人に回さなきゃ，みたいな気持ちもあった．でもたぶん一番強かったのは，外国で暮らしてみることにに対する好奇心のようなものだったと思う．今のご時世，留学してこそ，のような考えは時代遅れなのだろうが，やはり研究者たるのも，好奇心を失ってはいけないような気がするがいかがだろう，若者達よ．

そして，トキソプラズマ研究

さて，留学するにしても何をやろう？ 国際学会などでそんな話をすると，トリパノソーマ GPI 研究のラボからはもういつでも来い，みたいに（当時は）言われていたのだが，実はちょっと乗り気になれなかった．GPI の研究は面白かったのだが，特定の代謝経路だけで

はなく、やはりなんだか「生き物全体」を取り扱っているという実感が少し乏しいように感じていた。それともう一点、当時の日本の寄生虫学研究は、マラリアをやらずに寄生虫学にあらずのような雰囲気があった（と少なくとも私は感じていた）。当時はそれほど日本でのポジションにこだわりがあったわけではないのだが、一応、帰国する可能性も考えるとマラリアを研究していた方が有利なように思えた。ただ、内外問わずマラリア研究のラボの多くからはあまり「生き物全体」の匂いがしないし、みんながやっている対象を研究するのであればマウスや酵母を研究した方がいい（と当時は思っていた。あくまで個人的見解です。ご了承ください）。そういう現状の日本の中で、マラリアと適度な距離感があり、なおかつ誰もあまり対象としていないもの、ということで目についたのがトキソプラズマであった。今でこそ、獣医寄生虫学を中心にそれなりの研究者人口を誇るトキソプラズマ業界であるが、私が留学した 2004 年当時は明らかに日本では「斜陽」の業界であった（と当時は思っていた。しつこいようですが、あくまで個人的見解です）。一方で、世界に目を転じてみると、トキソプラズマ研究は非常に特徴的な実績が積み上げられていた。

ここで、トキソプラズマとその引き起こす感染症、トキソプラズマ症について概説しておこう。詳細については感染研 HP および感染研が刊行している感染症情報誌を参照していただきたい (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/3009-toxoplasma-intro.html>; 永宗, 2022)。実はトキソプラズマは最も成功した寄生虫のひとつである。というのも全人類の 1/3 以上がすでにトキソプラズマに感染しているからである。もちろん国や地域によって感染率に差があり、例えばブラジルなどは 80~90% 以上、ドイツやフランスなど欧州諸国も 50% 程度の感染率であるといわれている。日本においては最近は大規模な調査が行われておらず詳細は不明であるが、大体 5~10% 程度といわれている。通常、感染の自覚症状はなく、10 人にひとりくらいに風邪様の症状が出る程度である。したがって自身が感染しているかどうかは抗体の有無を検査することによるしかない。トキソプラズマ感染が問題となるのは主に 2 つのケースである。ひとつは既感染者が将来、ガンや臓器移植、AIDS などにより免疫不全に陥った場合である。この場合、感染者の免疫機能によって抑制されていたトキソプラズマが活発な増殖を再開し、致死的な脳炎を引き起こす（後天性トキソプラズマ症）。もうひとつは妊婦が初感染した場合である。その場合、原虫は妊婦が抗体による免疫能を獲得するまで、体内で活発に増殖する。そしてその一環として胎盤を超えて胎児の体内でも増殖し、死産、流産、そして出産できたとしても水頭症、脈絡膜炎による視力障害、脳内石灰化、精神運動機能障害などの症状を呈することがある（先天性トキソプラズマ症）。

トキソプラズマの終宿主はネコ科の動物、中間宿主はヒトを含むほとんどすべての哺乳動物、鳥類である。したがって、トキソプラズマはネコ科の動物に感染したときのみ、腸管内で雌雄に分化し、有性生殖を行

う。有性生殖後の原虫は固い殻をかぶったオーシストとよばれる状態で外界に排出される。オーシストは熱や乾燥などの刺激に耐性を有しており、外界で何年も安定に保持される。したがってネコの糞便から外界に出たオーシストは土壌や水などに広く拡散して存在するようになる。このオーシストの摂取がヒトへの第 1 の感染経路である。オーシストは当然のことながらヒトのみならず、ほとんどの温血動物やネコ科の動物にも感染能を有する。ヒトを含む中間宿主がオーシストを摂取した場合、原虫はその体内に広く拡散、増殖する。先天性トキソプラズマ症はこのタイミングで胎児に移行する。その後、宿主は抗トキソプラズマ抗体の産生を開始し、そのために原虫は増殖を停止し、組織シストという固い殻をかぶった状態となる。組織シストは抗体を通過させず、さらに組織シスト内の原虫はほとんど増殖を停止しているため抗トキソプラズマ薬も作用せず、したがって感染動物は原虫を排除することができず一生感染し続けることとなる。この組織シストを含んだ動物の筋肉や脳を摂食することで原虫は次の宿主へと移行することが可能となる。トキソプラズマの生活環の大きな特徴として、中間宿主—終宿主の経路のみならず、中間宿主—中間宿主の感染も成立することがあげられる。すなわち中間宿主であるヒトには他の中間宿主である「すべての哺乳動物、鳥類」からの感染が可能である。これがヒトへの第 2 の感染経路である。なお、組織シストはオーシストと名前は似ているが別物であり、外界からの刺激に非常に弱いことは強調しておく。組織シストは -12°C 以下での凍結、 67°C 以上への加熱によって死滅する。

当時、トキソプラズマ研究には多くの魅力的なテーマが出そろい、精力的な研究が行われていた。いくつか具体例をあげると、(1) トキソプラズマはトリパノソーマとは異なり、宿主細胞内に寄生し、その中で増殖する。そしてトキソプラズマが感染可能な細胞は基本的にすべての有核細胞である。つまり、トキソプラズマは基本的に「すべての温血動物のすべての有核細胞」に感染できる。この驚異的な宿主特異性の低さの分子生物学的基盤はどこにあるのだろうか。また、(2) 宿主細胞内でトキソプラズマは宿主の遺伝子発現を変化させ、自分の生存環境を自身にとって都合のいいように変化させるのであるがそのメカニズムは？さらにこの頃には、(3) トキソプラズマは宿主細胞のみならず、宿主の行動をも変化させているらしいことがわかり始めてきていた。一体どうやって？(4) どうもトキソプラズマには遺伝型が 3 つしかないようで、病原性の強弱がその遺伝型の違いで規定できているようだ、などである。そしてそれら諸問題の多くは、原虫の運動、宿主細胞への侵入とリンクしているように思えた。

トキソプラズマやマラリア原虫などアピコンプレクサ生物にとって、宿主細胞への侵入は自身の生存にとって必須である。アピコンプレクサ生物の宿主細胞への侵入は、細菌などでよく見られる宿主のエンドサイトーシスを借用したものとは異なり、自身の運動を用いた能動的なものである。そして（当時の理解では少

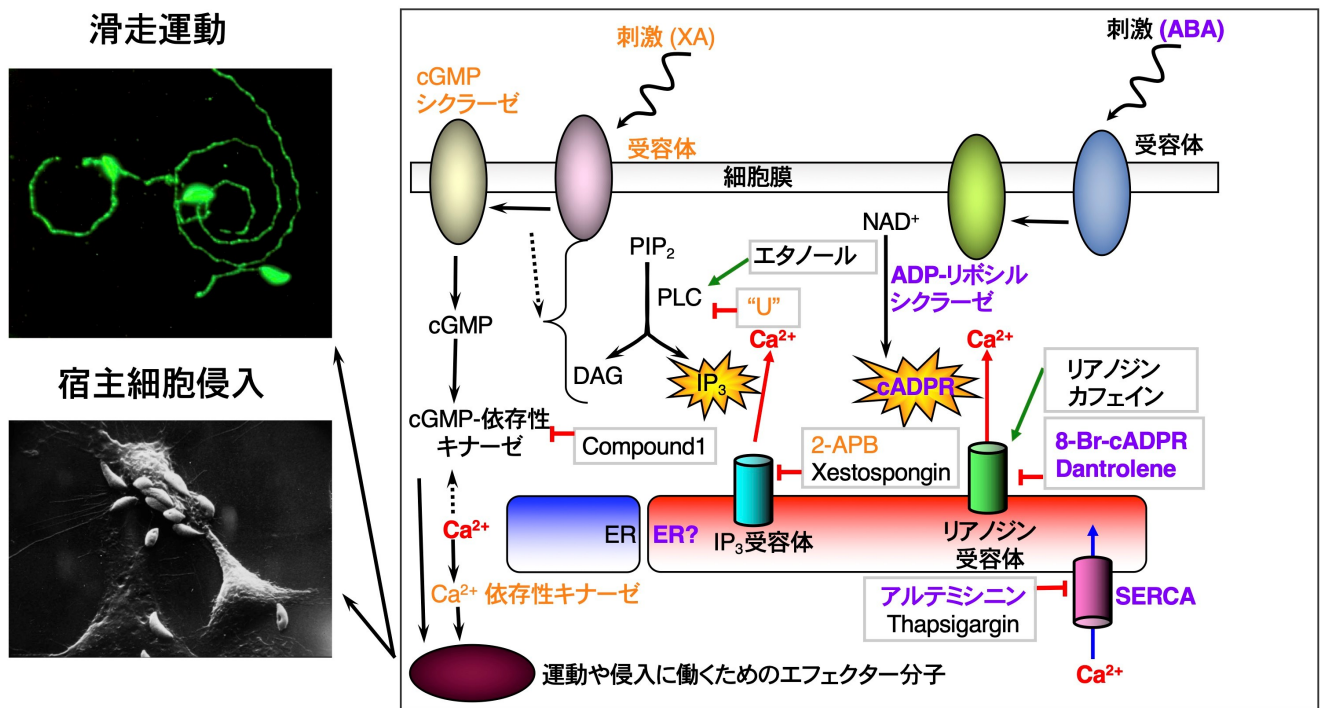
なくとも) トキソプラズマにとって運動には、マイクロネームとよばれる分泌器官からの付着タンパク質群の分泌がリンクしており、マイクロネームタンパク質群は(当時から)何十種類もあると考えられていた(Lebrun et al., 2020). さらにトキソプラズマは、宿主細胞への侵入とは独立して、しかし侵入の際に、別の分泌器官であるロプトリーから多くのタンパク質を宿主細胞へと注入し、そしてこれらの注入されたタンパク質群が遺伝子発現の変化を含む宿主細胞の修飾や病原性の強弱を規定している可能性が議論されていた(Lebrun et al., 2020). このようにトキソプラズマの寄生成立や病原性の規定にとって「原虫の運動」がキーであるということが、様々な論文を読んでいると想起できた。そして原虫の運動は、カルシウムイオン濃度を変化させることによって制御していることが示唆されていた。

ということで、内外の自分を取り巻く現状を理解し、数多くの論文を読んだ結果、トキソプラズマの運動とそれを制御している(ように思われる)カルシウムシグナリングの研究を志し、2004年の5月にアメリカはセントルイスにある Washington University の Dr. L. David Sibley の元へと留学したのであった。当時カルシウムシグナリングについてわかっていたことは以下の通りであろう(図3)。細胞内には Ca^{2+} をプールしている場所があり、それは一般の細胞においては小胞体や液胞である。小胞体にはイノシトール 3 リン酸 (IP_3) 受容体 (IP_3R) という Ca^{2+} チャンネルがあり、 IP_3 の刺激に応じて Ca^{2+} を細胞質内へと放出する。よく似た仕組みとしてリアノジン受容体 (RyR) という Ca^{2+} チャンネルがあり、そちらは cyclic ADP-ribose (cADPR) をセカンドメッセンジャーとして使っている。細胞質内へ放出された Ca^{2+} は sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) という Ca^{2+} ポンプによって小胞体へと回収される。

前述したとおり、その頃の私は“degenerate PCR 法”の職人を自負していたし、トリパノソーマを始めた頃と比べて多くの生物種の遺伝子データもかなり整備されていた。 IP_3R や RyR についての遺伝子情報の蓄積も充分あるように見えた。とりあえず、ボスと相談した上で、2つの受容体のトキソプラズマオーソログの同定を当面のテーマとすることにした。まあこれだけの情報があれば「存在する遺伝子であれば捕まえられるでしょ」というくらいの軽い気持ちで始めてみたのであるが、 IP_3R も RyR も・・・全くとれない。「まずい! なんか大口たたいて日本から来た変なヤツが案の定、口だけだった」なんて思われては渡米1ヶ月にして早くもお先真っ暗だ。実験家としてはまずこういうときは焦らずコントロールを取って条件検討を行う。とりあえず、契約にはなかった SERCA で試してみると・・・できた。続いて遺伝子全領域をクローニングしてみると・・・これもできた。うむ、ライブラリーの質と研究室の環境、実験者の腕には問題ないようだ。ボスとのミーティングは2週間に1度。確か、2ヶ月か3ヶ月たった頃、それまでは住環境や研究環境のセットアップについてのやりとりが主だったボスとの

ミーティングで、つたない英語で思い切って言ってみた。「 IP_3R も RyR も取れません。存在するものであれば私に取れるはずなので、どうも既知のチャンネルとのホモロジーでは取れないのではないかと、いや、大げさに言っている訳ではありません。その証拠に SERCA であればもう全長が取れています。」そしてその日から、プロジェクトの2番目としてトキソプラズマにおける SERCA の性状解析が加わったのである。この SERCA のプロジェクトによって、私はトキソプラズマの運動や細胞侵入、 Ca^{2+} に関する様々なアッセイ法を習得できた(Nagamune et al., 2007a; Nagamune et al., 2007b)。しかし、ボスとの「 IP_3R も RyR も取れません。でも私の技術が悪いんじゃない。なぜなら、これなら取れた、あれなら取れた・・・」というやりとりはその後恒例行事のように毎回続いた。そしてちょうどこの頃、マラリア原虫に続いてトキソプラズマのドラフトゲノムデータが取れてきていて、遺伝子のアノテーションが様々な計算モデルを用いて行われていた。小うるさい日本人はおそらくこのやりとりによって、まだ未発表であったトキソプラズマゲノムのデータにアクセスでき、カルシウム関連の遺伝子のアノテーションを行った。この貢献により、私はトキソプラズマドラフトゲノム完成の論文の著者のひとりに加えてもらえるはずであったのだが、なんと、このプロジェクトは結局論文化されることはなかったのである。私はこの驚きの顛末を一応プロジェクト参加者の末端として聞くことができた。ここでそれを文章化するのは憚られるので、その辺りは今度学会で会ったときの飲み会の席でということで・・・しかし、原生生物の世界でマラリア原虫に続いてゲノムが読まれたのはトキソプラズマであるということだけは、歴史に埋もれてしまわないようここに記しておきたい。そして私個人としてはこの時期のボスとのやりとりの結果を中心として、マラリア原虫、トキソプラズマ、そしてそれらに近縁のクリプトスポリジウムの3種類のゲノムから Ca^{2+} シグナリングに関係する遺伝子の網羅的な同定、比較という内容で論文化できたのでまあ最低限よしとしておこう(Nagamune and Sibley, 2006)。

コンピュータを用いた遺伝子の同定はどちらかというと夜の仕事にしていた。本当であれば昼間の実験機器が混み合う時間にドライな解析をしておいて、人が減ってくる夜間にウエットな実験を入れる方が効率いいのであるが、私が留学した先のセントルイス市は実は全米でも有数の治安の悪さを誇っており、実際2020年の統計でも凶悪犯罪発生件数において、デトロイトに次いで全米ワースト2位であったようである(<https://www.fbi.gov/services/cjis/ucr>)。大体、私がアメリカにいた頃から、この種の統計ではセントルイス、デトロイト、ボルチモアがいつもワースト3を争っていることがほとんどだ。ということで、夜はあまり遅くならないように、例えば銃声が聞こえてきたら(!)、手早くかたづけて帰宅できるようになどと考えると、いつでも「店じまい」できるドライな解析を夜間にする方が安全なのである。ちなみに日本人の大学院生やボスドクの平均的な労働はアメリカでは超勤勉に相当す



私の研究で明らかとなった経路

マラリア原虫の研究からの知見

図 3. トキソプラズマとマラリア原虫におけるカルシウムシグナリング. 緑の矢印は inducer, 赤は inhibitor. 紫色の部分は著者がトキソプラズマを用いた解析で明らかにした部分. オレンジ色はマラリア原虫における知見. それ以外はトキソプラズマにおける知見を示す. これらの生物の細胞内における Ca^{2+} プールは他種生物における知見からおそらく小胞体 (ER) であろうと考えられているが厳密には証明されていない. 本図では “ER?” と示し, ER とは区別して表記する. このようなカルシウムシグナリングが, 滑走運動や宿主細胞侵入の調節機能を担っている (図左). cGMP: cyclic guanosine monophosphate, XA: xanthurenic acid, ABA: abscisic acid; アブシジン酸, PIP_2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PLC: phospholipase C, DAG: diacylglycerol, IP_3 : inositol trisphosphate, “U”: U73122 (Moudy et al., 2001), compound 1: trisubstituted pyrrole 4-[2-(4-fluorophenyl)-5-(1-methylpiperidine-4-yl)-1H-pyrrol-3-yl] pyridine (Wiersma et al., 2004), NAD: nicotinamide adenine dinucleotide, cADPR: cyclic ADP-ribose, 2-APB: 2-Aminoethoxydiphenylborane, ER: endoplasmic reticulum, SERCA: sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase

るので気をつけておいた方がいい. あまりにも働きすぎると, アメリカ人の大学院生などが変に勘違いして教会のバザーや謎のパーティーへ拉致されることになる. さて, 昼間に何をしていたのかであるが, 最初は練習として, 共同研究の請負をしていた. RyR の専門家と共同でトキソプラズマの RyR 活性の薬理学的生化学的解析をしていた. これらの解析から RyR 本体の同定はできていないものの受容体活性の存在, そしてセカンドメッセンジャーである cADPR の存在やさらに cADPR 産生酵素および分解酵素活性の存在を生化学的に証明することに成功した (Chini et al., 2005). その際に種々の RyR アゴニストやアンタゴニストを原虫に加えてその反応を見ていたのであるが, その一連の試薬の中に植物ホルモンであるアブシジン酸をコソソリ加えていたのであった. 「コソソリ」というのも, 実はアブシジン酸が植物において cADPR 依存的な遺伝子発現調節を行っているという論文 (Wu et al., 1997) を偶々見つけて, 「アゴニスト・アンタゴニスト注文したいお買い物リスト」の中の一品としてボスに提示し

ていたのであるが, あえなく却下されたものの中にアブシジン酸は含まれていた. リスト化するとかなりの大きな金額となることもあり, 今の私でも却下するであろうからボスの選択は間違いではなかった. しかし, 渡米 2 年目の私はちょうどその頃に額は小さいものの NIH のグラントが当たったところであり, 気が大きくなっていた. そこで私は偶々リストから削除し忘れていたような体でコソソリと買ってしまったのである. 購入してトキソプラズマに振りかけてみると, あら不思議! 見事に cADPR の産生が誘導され, トキソプラズマ細胞質へも Ca^{2+} の放出が誘導された. そしてここを起点として, トキソプラズマが植物ホルモンであるアブシジン酸を産生しており, トキソプラズマはアブシジン酸を原虫の宿主細胞からの脱出のシグナルとしているという結果をまとめて Nature 誌に報告できた (Nagamune et al., 2008).

さてここで, 私がここまで明らかにしてきたトキソプラズマにおけるカルシウム経路 (図 3 紫) を, 他の研究者がトキソプラズマにおいて証明した経路, マラ

リア原虫を用いた研究で明らかになった経路 (図3 オレンジ) を合わせて、アピコンプレクサ生物におけるカルシウムシグナリング経路としてまとめてみることにしよう (図3) . アピコンプレクサ生物においてもカルシウムシグナリング経路は外部からの刺激によって起動する。その刺激物質として以前から知られていたのが、マラリアにおける分化誘導物質である xanthurenic acid (Billker et al., 1998) と今回私が見出したトキソプラズマの宿主細胞外脱出シグナルであるアブシジン酸である。これらの受容体は未同定なのであるが、その刺激はそれぞれグアニル酸シクラーゼと ADP シクラーゼへと伝達される。グアニル酸シクラーゼによって産生された cGMP は、cGMP 依存性キナーゼ、あるいはさらに Ca^{2+} 依存性キナーゼを介してマラリア原虫の性分化を誘導する。また同時にこの経路は IP_3 受容体を介した Ca^{2+} 放出経路も同時に活性化しているようである。 IP_3 経路は哺乳動物の神経細胞などで明らかにされてきた経路で、セカンドメッセンジャーである IP_3 による刺激で、(哺乳動物では) 小胞体にプールされている Ca^{2+} が、 Ca^{2+} チャンネルである IP_3 受容体により細胞質内に放出される。この IP_3 受容体は日本人である御子柴克彦先生により発見された (Hamada and Mikoshiba, 2020) . 小胞体にはもう 1 種類 Ca^{2+} チャンネルの存在が知られており、それがリアノジン受容体である。リアノジン受容体はアブシジン酸の受容体の下流にある ADP-リボシルシクラーゼによって産生された cADP-ribose をセカンドメッセンジャーとして用いて Ca^{2+} の細胞質への放出を行う。したがってアブシジン酸はこちらの経路によって細胞質内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる。 IP_3 受容体の阻害剤として 2-Aminoethoxydiphenylborane (2-APB) や xestospongine が、リアノジン受容体の活性誘導剤としてリアノジンやカフェインが、阻害剤として 8-bromo-cADP-ribose や dantrolene が知られている。アピコンプレクサ生物におけるカルシウムプールは厳密には明らかになっていないが、これらの受容体のアゴニストやアンタゴニストが機能することからこれらの受容体の存在が強く示唆され、やはり Ca^{2+} プールは小胞体なのだろうと考えられている。このようにして濃度が上昇した細胞質内 Ca^{2+} が先ほどの Ca^{2+} 依存性キナーゼやその他の Ca^{2+} 結合タンパク質に結合することで細胞運動や細胞分化などの機能を発揮すると考えられている。さてこうして細胞機能の変化に使われた Ca^{2+} は使用後には再びプールに戻らなければならない。この Ca^{2+} の回収に使われるのが SERCA である。SERCA は細胞質内の Ca^{2+} をプール (哺乳動物では小胞体) に輸送する Ca^{2+} ポンプである。Thapsigargin が阻害剤としてよく知られているが、トキソプラズマにおいては抗マラリア薬であるアルテミシニンも SERCA の機能を阻害する (Nagamune et al., 2007b) .

帰国とまとめ

とまあこのあたりで、私は日本に帰国し、筑波大学にテニユアトラックのポジションを与えていただき、さらに国立感染症研究所に異動して今に至るというわけである。こうして改めて自分の研究人生を振り返って

みると、やはり「運」の要素は非常に大きかったといわざるを得ない。しかし同時に運をつかむまでにはそれ相応の努力もしていたように感じる。“The goddess of luck has only bangs” (幸運の女神には前髪しかない) という言葉がある。木下タロウ先生の奥様である圭子さんがよく言っていた言葉であるが、今振り返ってみると、改めて実感として分かったような気がする。幸運はいつ来るかわからないが、いつ来てもいい様に常日頃から準備をしておく。そして来たチャンスに対しては素早く決断して決して逃してはならない。なぜならば幸運の女神には後ろ髪がないのだから、通り過ぎた後からではもう彼女をつかむことはできないのである。と、ちょっと説教臭くなったところで、若い皆さんのご活躍を祈りつつ、そろそろ年寄りの説教はやめにしておくこととする。あれ？電気泳動もそろそろ終わったんじゃないの？さあ、実験、実験！

謝辞

学会賞に推薦してくださいました、法政大学・島野智之教授に深く感謝いたします。また、本総説を執筆する機会を与えてくださいました、矢吹彬憲 和文誌「原生生物」編集長、道羅英夫 前編集長に深く感謝いたします。私の研究人生において様々な示唆、ご指導ご鞭撻を賜りました大阪府立大学・大石巖先生、大阪大学微生物病研究所・山本耕一郎先生、本田武司先生 (いずれも当時)、木下タロウ先生、木下圭子さん、Washington University School of Medicine・L. David Sibley 先生、筑波大学・橋本哲男先生、国立感染症研究所・野崎智義先生 (当時) に深く感謝いたします。

引用文献

- Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A. E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R. E. and Morris, H. R. (1998) Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* 392, 289–292. doi: 10.1038/32667.
- Borges, A. R., Link, F., Engstler, M. and Jones, N. G. (2021) The glycosylphosphatidylinositol anchor: a linchpin for cell surface versatility of trypanosomatids front. *Cell Dev. Biol.* 9, 720536. doi: 10.3389/fcell.2021.720536.
- Chini, E. N., Nagamune, K., Wetzel, D. M. and Sibley, L. D. (2005) Evidence that the cADPR signalling pathway controls calcium-mediated microneme secretion in *Toxoplasma gondii*. *Biochem. J.* 389, 269–277. doi: 10.1042/BJ20041971.
- Duffy P. E. (2022) Making a good malaria vaccine better. *Trends Parasitol.* 3, 9–10. doi: 10.1016/j.pt.2021.11.006.
- Eisenhaber, B., Bork, P. and Eisenhaber, F. (1998) Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng.* 11, 1155–1161. doi: 10.1093/protein/11.12.1155.
- Hamada, K. and Mikoshiba, K. (2020) IP_3 receptor plasticity underlying diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* 82, 151–176. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034433.
- Hong, Y., Nagamune, K., Ohishi, K., Morita, Y. S., Ashida, H., Maeda, Y. and Kinoshita, T. (2006a) TbGPI16 is an essential component of GPI transamidase in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* 50, 603–606. doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.075.

- Hong, Y., Nagamune, K., Morita, Y. S., Nakatani, F., Ashida, H., Maeda, Y. and Kinoshita T. (2006b) Removal or maintenance of inositol-linked acyl chain in glycosylphosphatidylinositol is critical in trypanosome life cycle. *J. Biol. Chem.* 281, 11595–11602. doi: 10.1074/jbc.M513061200.
- Lebrun, M., Carruthers, V. B. and Cesbron-Delauw, M.-F. (2020) *Toxoplasma* secretory proteins and their roles in parasite cell cycle and infection. In: *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan-perspective and methods. Weiss, L. M. and Kim, K. (ed.). Academic Press, London, pp. 607–704.
- Miyata, T., Takeda, J., Iida, Y., Yamada, N., Inoue, N., Takahashi, M., Maeda, K., Kitani, T. and Kinoshita, T. (1993) The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* 259, 1318–1320. doi: 10.1126/science.7680492.
- Moudy, R., Manning, T. J. and Beckers, C. J. (2001) The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 276, 41492–41501. doi: 10.1074/jbc.M106154200.
- Nagamune, K., Yamamoto, K., Naka, A., Matsuyama, J., Miwatani, T. and Honda, T. (1996) *In vitro* proteolytic processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytolysin/hemolysin (pro-HlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/protease of *V. cholerae*, trypsin, and other proteases. *Infect. Immun.*, 64, 4655–4658. doi: 10.1128/iai.64.11.4655-4658.1996.
- Nagamune, K., Yamamoto, K. and Honda, T. (1997) Intramolecular chaperone activity of the pro-region of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin. *J. Biol. Chem.* 272, 1338–1343. doi: 10.1074/jbc.272.2.1338.
- Nagamune, K., Nozaki, T., Maeda, Y., Ohishi, K., Fukuma, T., Hara, T., Schwarz, R. T., Sutterlin, C., Brun, R., Riezman, H. and Kinoshita, T. (2000) Critical roles of glycosylphosphatidylinositol for *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 10336–10341. doi: 10.1073/pnas.180230697.
- Nagamune, K., Ohishi, K., Ashida, H., Hong, Y., Hino, J., Kangawa, K., Inoue, N., Maeda, Y. and Kinoshita T. (2003) GPI transamidase of *Trypanosoma brucei* has two previously uncharacterized (trypanosomatid transamidase 1 and 2) and three common subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 10682–10687. doi: 10.1073/pnas.1833260100.
- Nagamune, K., Acosta-Serrano, A., Uemura, H., Brun, R., Kunz-Renggli, C., Maeda, Y., Ferguson, M. A. and Kinoshita, T. (2004) Surface sialic acids taken from the host allow trypanosome survival in tsetse fly vectors. *J. Exp. Med.*, 199, 1445–1450. doi: 10.1084/jem.20030635.
- Nagamune, K. and Sibley, L. D. (2006) Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1613–1627. doi: 10.1093/molbev/msl026.
- Nagamune, K., Beatty W. L. and Sibley, L. D. (2007a) Artemisinin induces calcium-dependent protein secretion in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell* 6, 2147–2156. doi: 10.1128/EC.00262-07.
- Nagamune, K., Moreno, S. N. and Sibley, L. D. (2007b) Artemisinin-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* have altered calcium homeostasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3816–3823. doi: 10.1128/AAC.00582-07.
- Nagamune, K., Hicks, L. M., Fux, B., Brossier, F., Chini, E. N., Sibley, L. D. (2008) Abscissic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature* 451, 207–210. doi: 10.1038/nature06478.
- 永宗喜三郎, (2022) トキシプラズマ症. *Infect. Agents Surveill. Rep.*, 43, 印刷中
- Ohishi, K., Nagamune, K., Maeda, Y. and Kinoshita, T. (2003) Two subunits of glycosylphosphatidylinositol transamidase, GPI8 and PIG-T, form a functionally important intermolecular disulfide bridge. *J. Biol. Chem.* 278, 13959–13967. doi: 10.1074/jbc.M300586200.
- Stephens, N. A., Kieft, R., Macleod, A. and Hajduk, S. L. (2012) Trypanosome resistance to human innate immunity: targeting Achilles' heel. *Trends Parasitol.* 28, 539–545. doi: 10.1016/j.pt.2012.09.002.
- Takeda, J., Miyata, T., Kawagoe, K., Iida, Y., Endo, Y., Fujita, T., Takahashi, M., Kitani, T. and Kinoshita, T. (1993) Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. (1993) *Cell* 73, 703–711. doi: 10.1016/0092-8674(93)90250-t.
- Wiersma, H. I., Galuska, S. E., Tomley, F. M., Sibley, L. D., Liberator, P. A. and Donald, R. G. K. (2004) A role for coccidian cGMP-dependent protein kinase in motility and invasion. *Int. J. Parasitol.* 34, 369–380. doi: 10.1016/j.ijpara.2003.11.019.
- Wu, Y., Kuzma, J., Maréchal, E., Graeff, R., Lee, H. C., Foster, R. and Chua, N. H. (1997) Abscissic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* 278, 2126–2130. doi: 10.1126/science.278.5346.2126.