

**Fig. 1.** Analysis of transmembrane kinase (TMK) protein expression in *Entamoeba histolytica* trophozoites. (A) Western blot with anti-peptide antibodies specific for TMK39 and TMK54. Lysate from  $5.0 \times 10^6$  trophozoites was resolved in a large-well SDS-PAGE gel, transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane and cut into strips. Each strip was incubated with  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  of anti-TMK39 (a) or anti-TMK54 (b) that had been pre-incubated with the indicated amount of unconjugated peptide for 1 h at room temperature (RT). Anti-rabbit:AP (Sigma) was used for detection as recommended by the manufacturer. Antibodies recognised single bands of the expected size (127 kDa TMK39 and 100 kDa TMK54). (B) Populations of amoebae expressed more than one TMK. Permeabilized trophozoites were stained with antibodies against TMK39, TMK54, TMK-96 (PATMK), the Gal/GalNAc lectin or an irrelevant antibody (negative control) followed by an anti-rabbit:Cy3 conjugate. Flow cytometry was used to assess staining. Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) were used to gate on intact cells prior to data collection and 10,000 gated events were collected for each sample. The experiment was carried out three times and a representative histogram is shown.

analysis of the stained samples revealed homogenous expression of each TMK by more than 95% of cells within the population, compared with the anti-Ft negative control (Fig. 1B). The absence of distinct sub-populations strongly suggests that single amoebae express multiple TMKs at the protein level, further discounts the notion of antigenic variation, and points instead to the possibility of non-redundant function among TMK family members.

### 3.3. Localisation of TMK39 and TMK54

TMKs generally possess predicted signal-peptides of approximately 20 aa and single-pass transmembrane domains. Specific antibodies against PaTMK and cross-reactive antibodies against B<sub>1</sub> sub-family members have localised the corresponding proteins to punctate regions of the plasma membrane (Mehra et al., 2006; Boettner et al., 2008). As the cellular localisations of TMK39 and TMK54 are unknown, cellular fractionation and confocal microscopy were used to localise the two proteins in log-phase trophozoites. When an established method (Aley et al., 1980) was used to separate soluble, internal membrane and plasma membrane components, TMK39 and TMK54 were identified in both membrane fractions by Western blotting (Fig. 2A). As the proteins both contain canonical signal-peptides and membrane spanning regions, this was not surprising.

However, when TMK39 and TMK54 were localised using confocal microscopy, the pattern of plasma membrane staining in non-permeabilized cells was surprisingly different, with TMK39 in membrane microdomains (Fig. 2B). This difference was noticeable but less dramatic when the cells were permeabilized. In both instances, pre-incubation of the antibody ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and corresponding peptide (300 nM) competitively inhibited the staining (Fig. 2B). The accumulation of TMK39 in discrete regions of the plasma membrane is reminiscent of membrane microdomains, such as aggregated lipid rafts and cavaolae that are thought to be centres of cell signalling in metazoan organisms (Parton and Hancock, 2004; Pike, 2006; Pani and Singh, 2009), as well as *E. histolytica* (Laughlin et al., 2004). In contrast, the even distribution of TMK54 throughout the plasma membrane mirrored the localisation of the *E. histolytica* Gal/GalNAc lectin (Petri et al., 1987). In permeabilized cells, both proteins were occasionally found associated

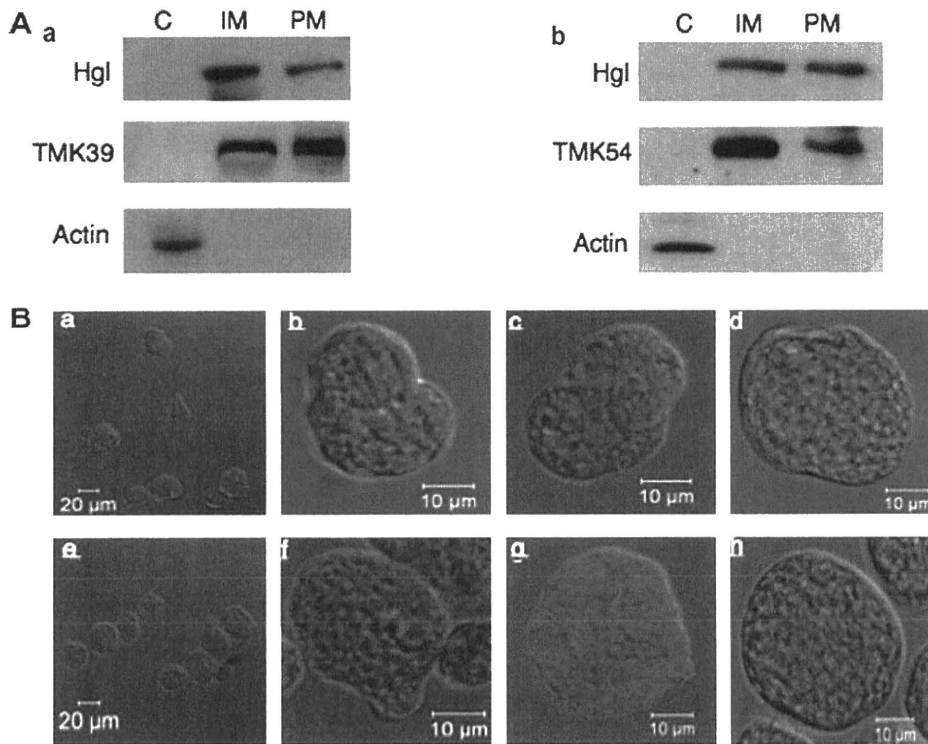
with internal vesicles, however TMK54 was more consistently associated with some type of large intracellular compartment (Fig. 2B). While the biological significance of the proteins awaits further investigation, the distinct localisation patterns observed implied that TMK39 and TMK54 served non-redundant functions.

### 3.4. Functional analysis of TMK39 and TMK54

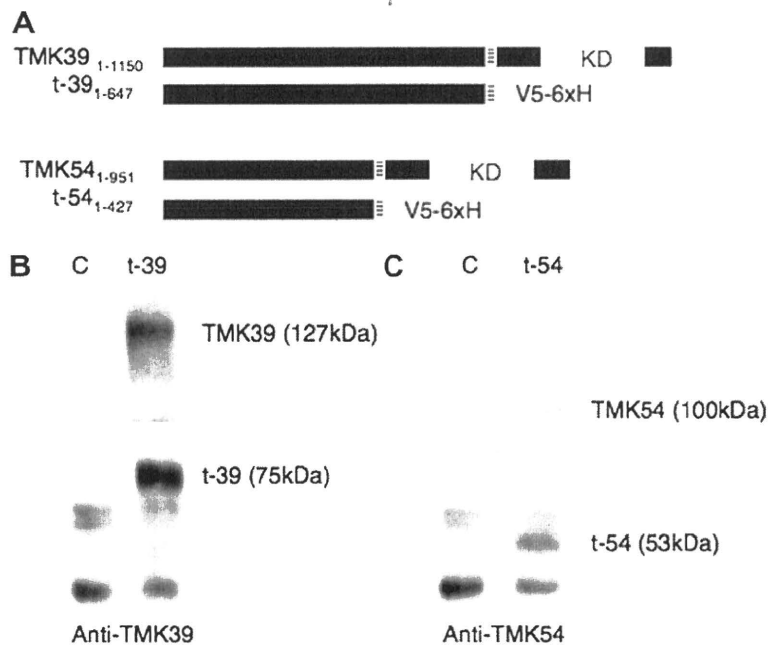
The kinase-containing intracellular regions of TMK39 and TMK54 were replaced with V5 and poly-histidine tags, and a tetracycline-inducible *E. histolytica* expression vector (Hamann et al., 1997) was used to over-express the truncated proteins, t-39 and t-54 respectively, in trophozoites (Fig. 3A). Parental vectors were transfected in parallel and served as a control for any unexpected effects of the induction of the tetO vector in the experiments. Each construct was used to generate at least two independently transfected clones. To confirm expression of the truncated proteins, cells were induced with  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  of tetracycline for 24 h and cellular lysate was subjected to immunoprecipitation using anti-V5 agarose. The anti-peptide antibodies described above were used to probe Western blots of the immunoprecipitations, and both t-39 (Fig. 3B) and t-54 (Fig. 3C) cells expressed proteins of the expected size.

Importantly, wild type and truncated proteins appeared to interact, as endogenous TMK39 and TMK54 co-immunoprecipitated with the corresponding truncated protein (Fig. 3B and C). Receptor kinases are generally activated by ligand-induced dimerization followed by trans-autophosphorylation of kinase domains (Lemmon and Schlessinger, 1994; Heldin, 1995). Consequently, over-expression of dominant-negative receptors that lack cytoplasmic kinase domains has long been used to study the biological relevance of receptor kinases (Ueno et al., 1991). Such truncated receptors bind ligand, fail to propagate a downstream signal, and can inhibit wild type receptors through ligand-induced heterodimerization of the truncated and wild type proteins. These mutants therefore allowed us to address the biological functions of TMK39 and TMK54.

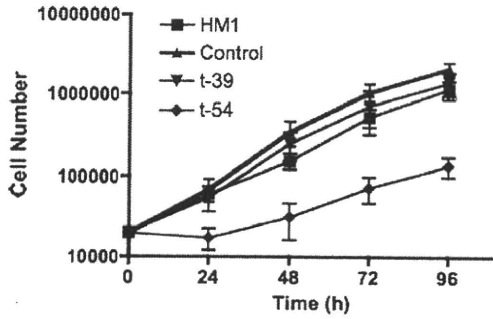
As shown in Fig. 4, cells induced to over-express t-54 had a severe growth defect during the first 24 h of induction but recovered to a near normal growth rate by 48 h (as indicated by the slope of



**Fig. 2.** Transmembrane kinases, TMK39 and TMK54 have discrete distributions at the cell surface. (A) *Entamoeba histolytica* trophozoites were lysed and fractionated. Trophozoite cytoplasmic (C), inner membrane (IM) and plasma membrane (PM) fractions were prepared for Western blot analysis. The panels were probed with anti-TMK39 (a) or anti-TMK54 (b), and in both instances, anti-Hgl and anti-actin antibodies were used as controls. Both TMK39 and TMK54 were expressed in membrane fractions. (B) Confocal images of non-permeabilized trophozoites are shown after staining with anti-peptide antibodies against TMK39 (a and b) and TMK54 (e and f). Permeabilized cells stained with anti-TMK39 (c) and anti-TMK54 (g) are also shown. As a control, antibodies were pre-incubated with the corresponding unconjugated peptides to competitively inhibit staining and staining with both anti-TMK39 (d) and anti-TMK54 (h) antibodies was abolished.



**Fig. 3.** Analysis of transmembrane kinase (TMK) function using a dominant-negative approach. (A) Depiction of the kinase domain (KD) deletions of TMK39 and TMK54 in t-39 and t-54, respectively. (B and C) Immunoprecipitation of t-39 and t-54. Amoebae were transfected with inducible expression vectors encoding t-39, t-54 or an empty vector control (C). Anti-V5 agarose was used to immunoprecipitate the truncated proteins from whole cell lysate. Western blots of immunoprecipitations are shown, probed with antibodies against TMK39 (B) or TMK54 (C). Heavy chain from the precipitating antibody is visible in every lane. As visualised, full-length wild type proteins co-immunoprecipitated with the truncated proteins in both instances. Separation between panels in B and C indicates different exposure times of blot to film.

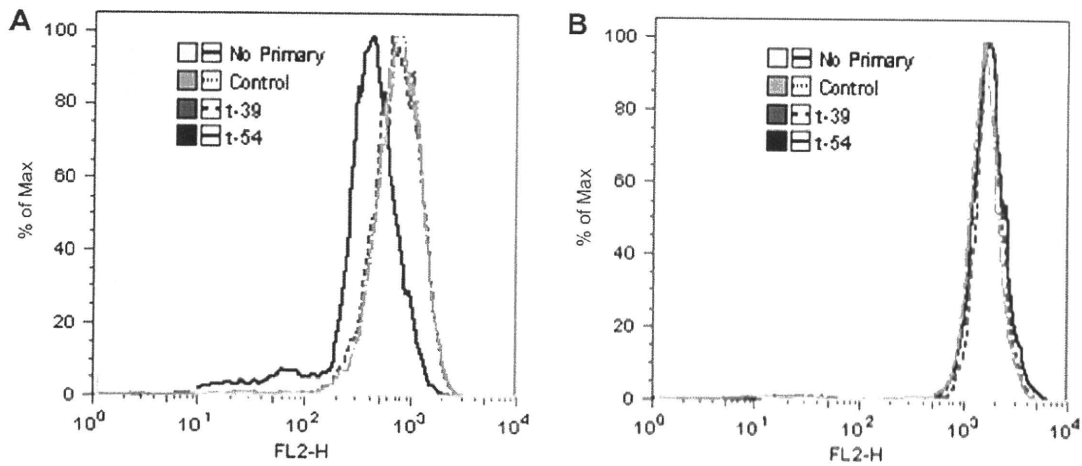


**Fig. 4.** Induction of t-39 and t-54 expression in *Entamoeba histolytica* trophozoites resulted in different phenotypes with respect to growth. Trophozoites were harvested during log-phase growth and 10,000 cells were seeded into media containing 10 µg/mL tetracycline. Cell numbers were assessed every 24 h for 4 days. For each construct at least two independently transfected clones were analysed. Each sample was assayed in duplicate and the graph represents the mean of three independent experiments  $\pm$  SD. For t-54 cells  $P < 0.05$  at every time point after 0 h compared with any of the other cell types.

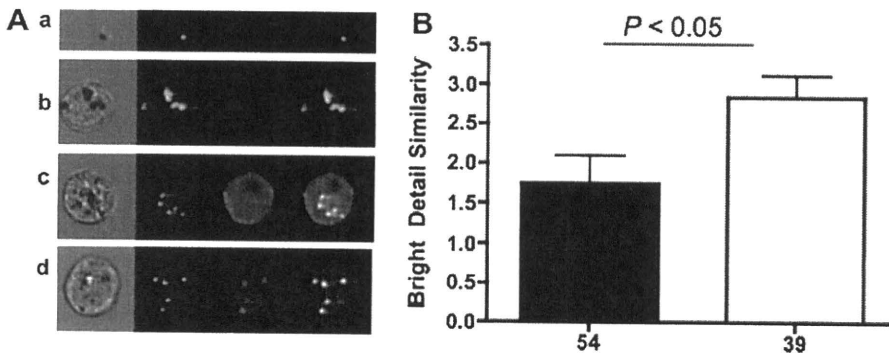
the line in Fig. 4). This was in contrast to t-39 cells, which had no defect. It is unclear how the t-54 cells were able to compensate for their growth defect.

To assess major cell surface changes in the mutant cell lines, flow cytometry was used to measure expression of the 170-kDa heavy subunit (Hgl) of the parasite’s Gal/GalNAc lectin. After 24 h of induction, total levels of Hgl were comparable in t-39, t-54 and control cells (Fig. 5B), but the levels of surface expressed Hgl were significantly ( $P < 0.05$ ) lower in t-54 cells (Fig. 5A).

Aside from this study, there is no published information available on the biological role of TMK54. However, TMK39 was identified at an early time point in an amoebic phagosomal proteome, and has therefore been implicated in the process of phagocytosis (Okada et al., 2006). To address the potential role of TMK39 in phagocytosis, we first assessed the extent of co-localisation between TMKs and ingested beads using multispectral imaging flow cytometry. Anti-peptide antibodies were used to stain trophozoites that had been allowed to ingest 2 µm carboxylate-modified fluorescent beads and samples were imaged using the Amnis ImageStream imaging cytometer. Beads were stained in an identical



**Fig. 5.** Expression analysis of the heavy subunit of the Gal/GalNAc lectin (Hgl) in mutant *Entamoeba histolytica* trophozoites. t-39, t-54 and empty vector transfected cells were induced with 10 µg/mL tetracycline for 24 h, stained with anti-Hgl antibodies and assessed by flow cytometry. As a control, cells were stained with secondary antibody only (no primary). Prior to data collection forward scatter and side scatter were used to gate for intact cells and 10,000 gated events were collected for each sample. The experiment was repeated more than three times and representative histograms are shown for non-permeabilized (A) and permeabilized (B) cells.  $P < 0.05$  for the mean fluorescence intensity (MFI) of non-permeabilized t-54 cells compared with the MFI of either control or t-39 cells.



**Fig. 6.** Co-localisation of transmembrane kinase 39 (TMK39) with negatively charged beads during phagocytosis. Multispectral imaging flow cytometry was used to assess co-localisation at the population level. *Entamoeba histolytica* trophozoites were allowed to ingest carboxylate-modified beads, fixed and stained with anti-peptide antibodies. Beads were stained alongside bead-containing cells. Samples were imaged using the Amnis ImageStream imaging cytometer. (A) Representative images are shown for beads stained (as a control) with anti-TMK39 (a), permeabilized, bead-positive cells stained with secondary antibody alone (b), anti-TMK54 (c) or anti-TMK39 (d). (B) ImageStream Data Exploration and Analysis Software (IDEAS) was used to calculate the Bright Detail Similarity score (a measure of co-localisation between fluorescence in different channels with higher numbers indicating more co-localisation and a score  $\geq 3$  indicating co-localisation) for permeabilized cells stained with anti-TMK39 and anti-TMK54, and results were plotted as mean Bright Detail Similarity (BDS)  $\pm$  SD for three independent experiments ( $P$ -value = 0.039).

manner to bead-containing cells to ensure that the anti-peptide antibodies and beads did not directly interact. While there was no evidence of non-specific binding of antibodies to beads, or of (as a control) co-localisation between TMK54 and ingested particles (Fig. 6A), TMK39 did appear to co-localise with ingested beads (Fig. 6A). Amnis IDEAS software was used to calculate the BDS score of single, in-focus, bead-positive cell images and the results are plotted in Fig. 6B as mean BDS  $\pm$  SD BDS scores are indicative of co-localisation between fluorescence in two channels: in this instance between ingested beads and TMKs. The mean BDS scores for permeabilized cells stained with TMK39 approached three (the accepted value for co-localised images) and TMK39 had higher BDS scores ( $P < 0.05$ ), indicating a greater extent of co-localisation.

As TMK54 did not appear in any phagosomal proteome (Marion et al., 2005; Okada et al., 2006; Boettner et al., 2008) or co-localise with ingested beads, and as t-54 cells had striking defects in growth and surface expressed Hgl levels, the ability of t-54 cells to phagocytose was not assessed. However, flow cytometry was used to measure the ability of t-39 cells to ingest carboxylate-modified fluorescent beads, CFSE-labelled apoptotic Jurkat cells and  $\text{Ca}^{2+}$  treated erythrocytes. Uptake of FITC-labelled dextran was also measured as a marker of fluid phase pinocytosis. As shown in Fig. 7A and B, t-39 cells were significantly impaired in their ability to ingest carboxylate-modified beads and apoptotic Jurkat cells. The defect was specific, as t-39 cells were unimpaired in their ability to uptake FITC-dextran and  $\text{Ca}^{2+}$  treated erythrocytes.

#### 4. Discussion

The most important conclusion from these studies is that single *E. histolytica* trophozoites express multiple members of a large TMK family and utilise the TMKs for non-redundant functions. While large families of TMKs have been considered hallmarks of

multi-cellularity, the life cycle of *E. histolytica* provides clues as to why the protist would require an extensive network of cell surface signalling molecules. In the complex intestinal microenvironment, the organism must compete with bacteria for nutrients and space, sense stressors to regulate developmental changes between cyst and trophozoite, subvert host defences, ingest bacteria and control its invasive behaviour. Upon invasion, trophozoites continue to face a battery of challenges that require the ability to chemotax, adhere, kill and ingest human cells, and obtain sufficient nutrients. Survival of *E. histolytica* within its human host must require a profound ability to sense and respond to environmental challenges and utilisation of the extensive TMK network may therefore be critical.

Single cell microarray analysis demonstrated expression of multiple members of TMK sub-families A, B<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> and E. Expression of multiple sub-family members by a single cell raises the possibility that the TMK sub-families function in a complex manner similar to ErbB receptors in mammalian cells. ErbB family members form homo- and hetero-dimers, bind to different ligands and can be transactivated by other proteins (Linggi and Carpenter, 2006). It will be important to keep in mind the potential for such complexity while initiating preliminary studies on TMKs.

A limitation of this analysis was the minute quantity of RNA obtained from a single cell. Previous reports indicate that trophozoite populations in culture or isolated from mice cumulatively express 65–80% of *E. histolytica* genes (Gilchrist et al., 2006). However, only 15–20% of genes were detected as expressed within a single cell. While the averaging of population data in previous studies may have partially contributed to such a discrepancy, it is more likely that false-negative calls were generated in this study, as single cell microarray analysis is an inherently insensitive technique (Esumi et al., 2008), and members of the TMK gene family have been generally shown to be expressed at low to medium levels in other

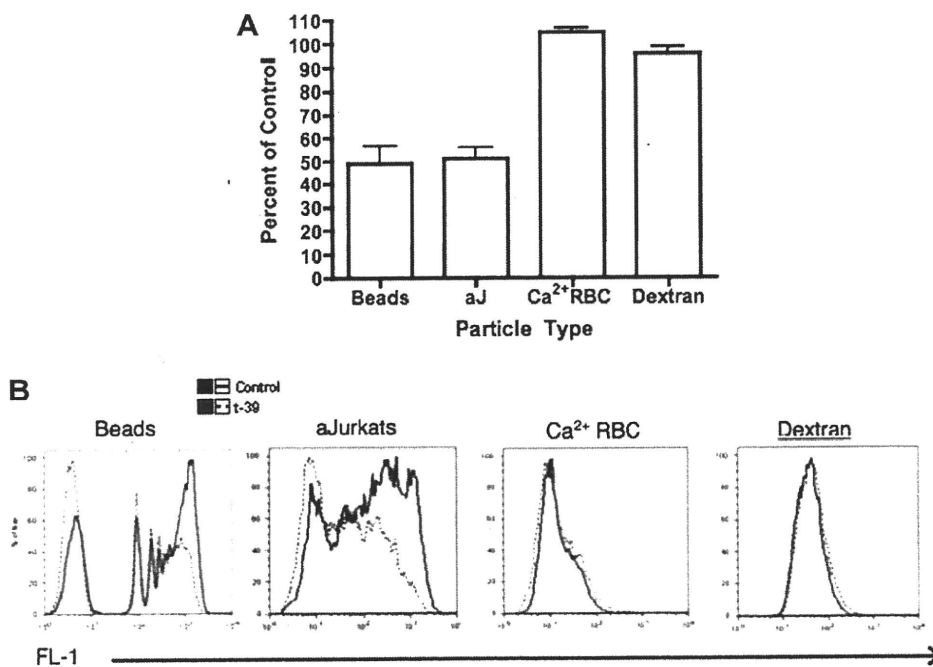


Fig. 7. Phagocytosis and pinocytosis in *Entamoeba histolytica* trophozoites induced to express t-39. (A) t-39 and empty vector transfected control cells were induced for 24 h with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tetracycline and allowed to ingest carboxylate-modified beads, carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labelled apoptotic Jurkat (aJ) cells, CFSE-labelled  $\text{Ca}^{2+}$  treated erythrocytes or FITC-labelled dextran. For each vector, at least two independently transfected clones were used in each experiment and the experiments were carried out more than three times. Samples were analysed by flow cytometry and the graph represents the mean fluorescent intensity (MFI) of t-39 cells plotted as a percentage of control cells. Error bars represent SD and  $P < 0.005$  for beads and apoptotic Jurkats compared with either  $\text{Ca}^{2+}$  treated erythrocytes or dextran. (B) Representative histograms are shown.

studies (expression levels in prior studies are accessible through NCBI's Gene Expression Omnibus GEO Series accession numbers GSE8484, GSE13023, GSE6648, GSE6650). Moreover, TMK54 was detected as present by Affymetrix® GCOS (in both cells), but TMK39 and PaTMK were both GCOS absent in this study. In contrast, more than 95% of trophozoites within a population expressed each TMK at the protein level. Consequently, we believe that the single cell TMK transcriptome described in this study should be considered a minimal estimate.

Additional similarities between metazoan and *Entamoeba* TMKs are likely to exist. For example, the widely studied metazoan TMKs are activated by ligand-induced dimerization (Lemmon and Schlesinger, 1994; Heldin, 1995) and typically contain extracellular furin-like and/or epidermal growth factor – (EGF) like moieties. Furin-like domains are thought to be involved with the aggregation of metazoan receptor tyrosine kinases and EGF-like moieties contribute to protein–protein interactions. Although the pairing of TMK and EGF or furin-like domains is a rare occurrence in protozoa, many TMKs (including both TMK39 and PaTMK) possess cysteine-rich extracellular domains containing furin-like and/or EGF-like moieties. We observed hetero-dimerization between wild type and truncated receptors in this study, which may indicate that TMKs are subject to the same ligand-induced dimerization events as their metazoan counterparts.

Without identification of receptor ligand or kinase substrate, it is not possible to definitively ascribe functions to any of the TMKs that have been studied thus far. However, we have discovered a variety of clues that can help us begin to understand the function of these proteins. The striking difference in the surface localisation patterns of TMK39 and TMK54 was the first indication that these proteins served non-redundant functions. The uniform cell surface staining of TMK54 was similar to that of the heterotrimeric Gal/GalNAc lectin that mediates adhesion, cytotoxicity, phagocytosis and complement resistance (Petri et al., 2002). It is currently unknown how the Gal/GalNAc lectin orchestrates such a wide variety of events but sequence similarity between the short cytoplasmic tail of Hgl and the cytoplasmic tails of  $\beta 2$  and  $\beta 7$ -integrins is considered to play a key role (Vines et al., 1998). Tyrosine phosphorylation of  $\beta$ -integrins stimulates their translocation to the cell surface (Naccache et al., 1994). Interestingly, t-54 cells expressed less Hgl on their surface compared with both t-39 and control cells, indicating that TMK54 may regulate Hgl surface expression. Additionally, t-54 cells had a striking growth defect during the first 24 h of t-54 protein induction, indicating that TMK54 may represent a major growth factor receptor. Cross-talk between growth factor receptors and integrins is also known to affect surface integrin levels (Somanath et al., 2009). Members of the B<sub>1</sub> family of TMKs have also been found to impact cellular proliferation but any impact on surface Hgl expression has not been described (Mehra et al., 2006). Future studies in our laboratory will address the biological role of TMK54 directly and examine the relationship between TMK54 and the Gal/GalNAc lectin.

In contrast to TMK54, TMK39 was localised to punctate regions of the plasma membrane, in a pattern reminiscent of membrane microdomains such as lipid rafts. As expected from its prior identification as a member of the phagosomal proteome (Okada et al., 2006), TMK39 was found to co-localise with ingested beads at the surface and to a greater extent within cells. Additionally, t-39 cells had a specific defect in their ability to ingest carboxylate-modified beads and apoptotic lymphocytes, but not Ca<sup>2+</sup> treated erythrocytes. PaTMK has been previously shown to play a role in uptake of Ca<sup>2+</sup> treated red blood cells (Boettner et al., 2008), providing additional evidence that TMKs serve non-redundant cellular functions. Considering previous studies that identified TMK39 as a component of the phagosomal proteome at early time points and the phenotype of t-39 cells, it is tempting to speculate that TMK39 may function as a scavenger

receptor and mediate the internalisation of polyanionic macromolecules. Although phosphatidyl serine (PS) is a critical “eat-me” signal recognised by phagocytes (Grimsley and Ravichandran, 2003), it is unlikely that TMK39 recognises the molecule because recognition of exposed PS on the surface of aged or Ca<sup>2+</sup> treated erythrocytes is known to impact uptake of red blood cells by *E. histolytica* (Boettner et al., 2005). Alternative “eat-me” signals, such as modified low density lipoprotein (LDL), are recognised by scavenger receptors that mediate the uptake of bacteria and apoptotic corpses in other systems (Grimsley and Ravichandran, 2003). TMK39 shares 30% identity with the *Drosophila* scavenger receptor eater across the first 200 aa of the proteins. Eater binds modified LDL and mediates uptake of bacteria, and the first 200 aa of eater are known to facilitate binding to polyanionic ligands (Kocks et al., 2005). Consequently, modified LDL is a candidate recognition signal for TMK39 and for *E. histolytica* phagocytosis of apoptotic lymphocytes.

In plants and metazoa, TMKs are known to regulate a myriad of cellular processes including cellular proliferation, survival, differentiation, migration, metabolism and host defence. This study suggests that TMKs are likely to mediate a similarly diverse and essential set of processes for this *E. histolytica*.

#### Acknowledgements

This work was supported by NIH grant 5R01 AI026649 (to W.A. Petri) and Grant-in-Aid for Scientific Research (to S. Hamano).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijpara.2009.12.007.

#### References

- Adam, R.D., Aggarwal, A., Lal, A.A., de La Cruz, V.F., McCutchan, T., Nash, T.E., 1988. Antigenic variation of a cysteine-rich protein in *Giardia lamblia*. *J. Exp. Med.* 167, 109–118.
- Aley, S.B., Scott, W.A., Cohn, Z.A., 1980. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 152, 391–404.
- Barrett, T., Suzek, T.O., Troup, D.B., Wilhite, S.E., Ngau, W., Ledoux, P., Rudnev, D., Lash, A.E., Fujibuchi, W., Edgar, R., 2005. NCBI GEO: mining millions of expression profiles – database and tools. *Nucleic Acids Res.* 33, D562–566.
- Beck, D.L., Boettner, D.R., Dragulev, B., Ready, K., Nozaki, T., Petri, W.A., 2005. Identification and gene expression analysis of a large family of transmembrane kinases related to the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell* 4, 722–732.
- Boettner, D.R., Huston, C.D., Linford, A.S., Buss, S.N., Houpt, E., Sherman, N.E., Petri, W.A., 2008. *Entamoeba histolytica* phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family. *PLoS Pathog.* 4, e8.
- Boettner, D.R., Huston, C.D., Sullivan, J.A., Petri, W.A., 2005. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. *Infect. Immun.* 73, 3422–3430.
- Borst, P., Genest, P., 2006. Parasitology: switching like for like. *Nature* 439, 926–927.
- Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quatannens, B., Tissier, J.P., Slomianny, C., Sartiaux, C., Alonso, C., Huart, J.J., Montreuil, J., Ameisen, J.C., 2001. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ.* 8, 1143–1156.
- Calderón, J., de Lourdes Muñoz, M., Acosta, H.M., 1980. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in entamoebae. *J. Exp. Med.* 151, 184–193.
- Champion, A., Kreis, M., Mockaitis, K., Picaud, A., Henry, Y., 2004. *Arabidopsis* kinome: after the casting. *Funct. Integr. Genomics* 4, 163–187.
- Diamond, L.S., 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science*, 134, 336–337.
- Esumi, S., Wu, S., Yanagawa, Y., Obata, K., Sugimoto, Y., Tamamaki, N., 2008. Method for single-cell microarray analysis and application to gene-expression profiling of GABAergic neuron progenitors. *Neurosci. Res.* 60, 439–451.
- Gilchrist, C.A., Houpt, E., Trapaidze, N., Fei, Z., Crasta, O., Asgharpour, A., Evans, C., Martino-Catt, S., Baba, D.J., Stroup, S., Hamano, S., Ehrenkauf, G., Okada, M., Singh, U., Nozaki, T., Mann, B.J., Petri Jr., W.A., 2006. Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 147, 163–176.
- Goldberg, J.M., Manning, G., Liu, A., Fey, P., Pilcher, K.E., Xu, Y., Smith, J.L., 2006. The *Dictyostelium* kinome – analysis of the protein kinases from a simple model organism. *PLoS Genet.* 2, e38.

- Grimley, C., Ravichandran, K.S., 2003. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol.* 13, 648–656.
- Hamann, L., Buss, H., Tannich, E., 1997. Tetracycline-controlled gene expression in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84, 83–91.
- Haque, R., Ali, I., Sack, R., Farr, B., Ramakrishnan, G., Petri, J., 2001. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *J. Infect. Dis.* 183, 1787–1793.
- Haque, R., Duggal, P., Ali, I., Hossain, M., Mondal, D., Sack, R., Farr, B., Beaty, T., Petri, J., 2002. Innate and acquired resistance to amebiasis in Bangladeshi children. *J. Infect. Dis.* 186, 547–552.
- Heldin, C., 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213–223.
- Huston, C.D., Boettner, D.R., Miller-Sims, V., Petri, W.A., 2003. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 71, 964–972.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., Speed, T.P., 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249–264.
- King, N., Carroll, S.B., 2001. A receptor tyrosine kinase from choanoflagellates: molecular insights into early animal evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 15032–15037.
- Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A.M., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., Stuart, L.M., Stehle, T., Hoffmann, J.A., Reichhart, J., Ferrandon, D., Rämet, M., Ezekowitz, R.A.B., 2005. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123, 335–346.
- Laughlin, R.C., McGugan, G.C., Powell, R.R., Welter, B.H., Temesvari, L.A., 2004. Involvement of raft-like plasma membrane domains of *Entamoeba histolytica* in pinocytosis and adhesion. *Infect. Immun.* 72, 5349–5357.
- Lemmon, M.A., Schlessinger, J., 1994. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.* 19, 459–463.
- Linggi, B., Carpenter, G., 2006. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* 16, 649–656.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934.
- Manning, G., Young, S.L., Miller, W.T., Zhai, Y., 2008. The protist, *Monosiga brevicollis*, has a tyrosine kinase signaling network more elaborate and diverse than found in any known metazoan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9674–9679.
- Marion, S., Laurent, C., Guillén, N., 2005. Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell. Microbiol.* 7, 1504–1518.
- Mehra, A., Fredrick, J., Petri, W.A., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., 2006. Expression and function of a family of transmembrane kinases from the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 74, 5341–5351.
- Naccache, P., Jean, N., Liao, N., Bator, J., McColl, S., Kubes, P., 1994. Regulation of stimulated integrin surface expression in human neutrophils by tyrosine phosphorylation. *Blood* 84, 616–624.
- Okada, M., Huston, C.D., Oue, M., Mann, B.J., Petri Jr., W.A., Kita, K., Nozaki, T., 2006. Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145, 171–183.
- Pani, B., Singh, B.B., 2009. Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium* 45, 625–633.
- Parsons, M., Worthey, E.A., Ward, P.N., Mottram, J.C., 2005. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 6, 127.
- Parton, R.G., Hancock, J.F., 2004. Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol.* 14, 141–147.
- Petri, W.A., Chapman, M.D., Snodgrass, T., Mann, B.J., Broman, J., Ravdin, J.I., 1989. Subunit structure of the galactose and *N*-acetyl- $\beta$ -galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 264, 3007–3012.
- Petri, W.A., Smith, R.D., Schlesinger, P.H., Murphy, C.F., Ravdin, J.I., 1987. Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* 80, 1238–1244.
- Petri, W.A., Haque, R., Mann, B.J., 2002. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 39–64.
- Pike, L.J., 2006. Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lipid Res.* 47, 1597–1598.
- Ravdin, J.I., Croft, B.Y., Guerrant, R.L., 1980. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 152, 377–390.
- Roberts, D.J., Craig, A.G., Berendt, A.R., Pinches, R., Nash, G., Marsh, K., Newbold, C.I., 1992. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* 357, 689–692.
- Shiu, S., Karlowski, W.M., Pan, R., Tzeng, Y., Mayer, K.F.X., Li, W., 2004. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell* 16, 1220–1234.
- Somanath, P.R., Ciocea, A., Byzova, T.V., 2009. Integrin and growth factor receptor alliance in angiogenesis. *Cell Biochem. Biophys.* 53, 53–64.
- Stockdale, C., Swiderski, M.R., Barry, J.D., McCulloch, R., 2008. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: joining the DOTs. *PLoS Biol.* 6, e185.
- Su, X., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Guinet, F., Herrfeldt, J.A., Peterson, D.S., Ravetch, J.A., Wellems, T.E., 1995. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum* – infected erythrocytes. *Cell* 82, 89–100.
- Teixeira, J.E., Huston, C.D., 2008. Participation of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein in amebic phagocytosis of apoptotic host cells. *Infect. Immun.* 76, 959–966.
- Ueno, H., Colbert, H., Escobedo, J.A., Williams, L.T., 1991. Inhibition of PDGF  $\beta$  receptor signal transduction by coexpression of a truncated receptor. *Sci., New Ser.* 252, 844–848.
- Vines, R.R., Ramakrishnan, G., Rogers, J.B., Lockhart, L.A., Mann, B.J., Petri Jr., W.A., 1998. Regulation of adherence and virulence by the *Entamoeba histolytica* lectin cytoplasmic domain, which contains a beta 2 integrin motif. *Mol. Biol. Cell* 9, 2069–2079.
- Ward, P., Equinet, L., Packer, J., Doerig, C., 2004. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* 5, 79.
- WHO/PAHO/UNESCO, 1997. A consultation with experts on amebiasis. Mexico City, Mexico 28–29 January, 1997. *Epidemiol. Bull.* 18, 13–14.

# 寄生虫感染と免疫応答

濱野真二郎\*・吉田 裕樹\*\*

寄生虫は真核生物であり、単細胞の原虫と多細胞の蠕虫に大別される。これら寄生虫による感染症は広く世界に蔓延するものの、罹患者の大部分が発展途上国に生きる貧しい人々であるために、顧みられることも少なく、多くの寄生虫疾患が『見捨てられた病気 Neglected Infectious Diseases』に分類される。その特徴は、長きにわたって人々の健康を損ない、その死亡率からは窺い知れないほど甚大な社会経済的な痛みと損失を生み出すことにある。われわれ人類は依然として『虫だらけの世界 Wormy World』に生きており、真核生物である寄生虫に対する既存の薬剤には、副作用や耐性病原体の出現など憂慮すべき点も多く、ワクチンや新規薬剤の開発が切望される。ワクチン開発のためには、各々の原虫・蠕虫に対する宿主の免疫応答や感染防御機構の理解が不可欠であり、本稿では寄生虫感染と免疫応答に関して、最新の知見を交えて概説したい。

## はじめに

寄生虫は真核生物であり、単細胞の原虫 protozoa と多細胞の蠕虫 helminth に大別される。蠕虫はさらに線虫 nematode, 吸虫 trematode, 条虫 cestode に区分される。これら寄生虫によって引き起こされる感染症は、発展途上国の貧しい人々を中心に広く世界に蔓延しており、われわれが生きる世界は、21世紀になっても依然として『虫だらけの世界 Wormy World』なのである<sup>1)</sup>。蚊によって媒介されるマラリアでは、アフリカの子供たちを中心に毎年、推計150~300万人の命が、赤痢アメーバ症では毎年およそ10万人の命が失われている。土壌媒介線虫の場合、蛔虫は8~12億人に、鉤虫は6~7億人に、鞭虫は6~8億人に感

染して住民の栄養を搾取している<sup>2)</sup>。かつて日本にも流行していた住血吸虫症には2億人が、蚊媒介性のリンパ系フィラリア症には1億2千万人が、ブユ媒介性のオンコセルカ症(河川盲目症)には3千7百万人が罹患していると推計され、マラリア同様に貧困にあえぐ人々の脅威となっている。これら寄生虫は生命の脅威となるばかりでなく、その多くは長期間ヒトに感染し、勤労意欲を失わせたり障害を残したりするため、甚大な社会経済的な痛みと損失を生み出し、地域や国が疲弊していく一因となる。そのような悪循環を断ち切るためにも、国際的な寄生虫対策が喫緊の課題となっている(表)。

国内に目を転じてみると、昭和20年前後の日本では、土壌伝播性の寄生虫(蛔虫・鉤虫など)が全

\*Shinjiro HAMANO 長崎大学熱帯医学研究所寄生虫学分野/教授

\*\*Hiroki YOSHIDA 佐賀大学医学部生体機能制御学分野/教授

表 TDR(国連熱帯病研究訓練特別計画)の対象疾患である、10の疾患に関する資料

	DALYs(*) (万年)	死亡者数(万人)
アフリカ・トリパノソーマ(アフリカ睡眠病)	152.5	4.8
デング熱	61.6	1.9
リーシュマニア症	209.0	5.1
マラリア	4648.6	127.2
住血吸虫症	170.2	1.5
結核	3473.6	156.6
シャーガス病	66.7	1.4
ハンセン氏病	19.9	0.6
リンパ系フィラリア症	577.7	0
オンコセルカ症(河川盲目症)	48.4	0

\*『World Health Report』ではDisease burden DALYsとなっている。DALYsは、“Disability Adjusted Life Years (the number of health years of life lost due to premature death and disability)”  
DALYsは、日本国際保健医療学会によると、「疾病により失われた生命や生活の質を包括的に測定するための指標として『障害を考慮した生存年数』と訳されている。

\* World Health Report 2004より

国的に蔓延しており、検便によると60~80%の人が何らかの寄生虫を保有していた。しかし高度成長後、日本ではこのような腸管寄生虫は激減した。この理由として、(1)農業における化学肥料の使用、(2)衛生知識の普及、(3)下水道普及などによる尿尿処理法の改善、などが挙げられる。他方、魚類、獣肉などの生食による寄生虫感染は依然として発生しており、グルメ時代を反映してむしろ増加傾向にある。また近年の国際化に伴い、マラリアなどの輸入感染症や、AIDS患者など易感染性宿主の増加を反映した寄生虫の日和見感染症が増加しており、迅速かつ適切な診断と治療が求められている<sup>3)</sup>。

かつて、本邦には日本住血吸虫症という風土病があった。皮膚炎から始まり、重症化すると肝硬変などを引き起こし死に至らしめる場合もある。1913年に九州帝国大学の宮入慶之助博士らが世界に先駆けてこの生活環を解明し、その後の住血吸虫症防圧の端緒となった。住血吸虫は、幼虫の一形態であるセルカリアが水中でヒトの皮膚を破って侵入し、人体門脈内で成虫となり、有性生殖をして卵を生む。この卵が便とともに排泄されると、水中で孵化してミラシジウムとなるが、虫卵が肝

臓まで達すると肝炎を引き起こし、重症化すると肝硬変を主体とした病態を呈する。水中を遊泳するミラシジウムはミヤイリガイの中に入り、貝の中で幼生生殖を繰り返して、数千のセルカリアを生み出す。このように、ヒトという終宿主だけでは住血吸虫の一生は成り立たず、必ず中間宿主を必要とする。日本は戦後、ミヤイリガイの生息する水路や河原を人工的に改変し、徹底的にミヤイリガイを駆除することによって、住血吸虫症を終息させた<sup>4)</sup>。しかし、このような対策は、発展途上国や広大な大陸では実現困難であり、プラジカンテルという住血吸虫に対する特効薬が出現した現在でも、世界は相変わらず住血吸虫症による重荷に喘いでいる。

前述したように、寄生虫感染は中間宿主やベクターを介して伝播するものが多く、それら中間宿主やベクターは、寄生虫防圧プログラムを遂行する際の格好の標的である。しかしながら、環境問題、薬剤耐性ベクターの出現、費用対効果などを考慮すれば、流行域に住む人々をターゲットにした感染予防、集団治療は非常に重要な方策である。寄生虫はヒトと同じ真核生物であり、原核生物である細菌を標的にした抗生物質は通常無効であ



る。また寄生虫に対する既存の薬剤には、薬剤耐性病原体の出現や重篤な副作用など憂慮すべき点も多い。イベルメクチン ivermectin は、北里大学名誉教授である大村智博士が見いだした放線菌由来の抗生物質を改良したものであり、オンコセルカ症、糞線虫症に著効するのみならず、犬フィラリアや外部寄生虫である疥癬に対する特效薬として世界中で重宝されている。かつて日本はバンクロフト糸状虫によるリンパ系フィラリア症の浸淫地であったが、ジエチルカルバマジン (diethylcarbamazin; DEC) という薬剤を用いた集団治療で同症の制圧に成功した。その成功経験は、WHOを中心としたリンパ系フィラリア症ならびにオンコセルカ症の撲滅計画 (Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis) に反映されており、本計画においてイベルメクチンが重要な役割を果たしている。一方、新規薬剤や有効なワクチンの開発を目指した挑戦も、粘り強く継続されている。東京大学の北潔教授らは、アスコフラノンがアフリカ睡眠病やナガナ病の病原体であるトリパノソーマ (原虫) に著効することを見出し、その実用化に向けて、さらなる研究を推し進めている<sup>5)</sup>。一方、寄生虫に対する感染防御機構の研究も根気強く続けられており、近年著しい進展が認められるために、本稿では寄生虫感染と免疫応答に関する新知見を含めて概説したい。

## I. 寄生虫の感染経路

寄生虫は経皮的もしくは経口的に宿主に感染する。経皮的に感染する場合は、ベクター媒介性の感染も含め、感染の場である皮膚でいきなり宿主と寄生虫のせめぎ合いが始まる。体液中に存在する補体やリゾチームなどの生理活性物質もしくは好中球やマクロファージに感受性の高い微生物は、病原体とはなりにくい。言い換えると、経皮感染する寄生虫は、そのような生体防御バリアをやすやすと乗り越えることができる病原体である。一方、経口感染する寄生虫は、胃酸などの消化酵素に抵抗性を示す必要がある。蠕虫では幼虫包蔵卵、嚢虫、プレロセルコイド、メタセルカリ

アなどの形態によって、原虫では嚢子 cyst やオシスト oocyst といった形態をとることによって胃を通過することが可能となる。小腸に到着すると、孵化・脱嚢・脱皮などを行い、目的とする寄生臓器を目指す。寄生虫がいったん組織に侵入すると、経皮感染した場合と同様に宿主とのせめぎ合いが始まる。

## II. 寄生虫に対する自然免疫応答

自然免疫は、宿主の樹状細胞上にあるパターン認識受容体 (Pattern recognition receptors; PRRs) が、微生物由来の病原体関連分子パターン (Pathogen associated molecular patterns; PAMPs) を認識することによって惹起される。その後、樹状細胞から炎症性サイトカインが産生されるとともに、樹状細胞上の共刺激分子の発現が上昇し、これらがリンパ球の活性化・分化を誘導し、引き続き獲得免疫応答をコントロールする。*Leishmania major* の lipophosphoglycan (LPG) や *Trypanosoma cruzi* の glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーは TLR2 によって、*Plasmodium falciparum* や *Toxoplasma gondii* の GPI アンカーや glycoinositolphospholipid (GPILs) は、TLR2 や TLR4 によって認識される。*T. cruzi* や *Trypanosoma brucei* の非メチル化 CpG モチーフ並びに *P. falciparum* 感染赤血球で産生されるヘモゾインは、TLR9 によって認識される。また、*T. gondii* の profilin 様タンパクは、TLR11 によって認識されると報告されている<sup>6)</sup>。上述のように、Toll 様受容体 (Toll like receptors; TLRs) は代表的な PRRs であり、TLR3 を除く全ての TLRs からのシグナル伝達には、細胞内アダプター分子 MyD88 が不可欠である。

宿主と寄生虫が出会った場合に発動される宿主の自然免疫応答は、組織に侵入した寄生虫が、原虫であるか蠕虫であるかによって大きく異なる。MyD88 を遺伝的に欠損した宿主は、ほとんど全ての原虫に対する感染防御能が低下する。つまり、樹状細胞上にある TLRs によって原虫由来の PAMPs を認識して自然免疫を惹起することが、

原虫に対する感染防御にとって重要である。上述したように、これら自然免疫による感染防御は、リンパ球による適切な獲得免疫を誘導して初めて有効に機能する。AIDS患者などCD4陽性T細胞が十分に機能しない状態で、トキソプラズマやクリプトスポリジウムの日和見感染が多発するのは、期せずしてこれら原虫に対する感染防御におけるリンパ球の重要性を示している。

一方、蠕虫由来の分子は、一般的に樹状細胞上に存在するTLRsを含むPRRsを刺激することがなく、誘導されてくる獲得免疫の質が全く異なる。本年、ナチュラルヘルパー細胞と呼ばれるリンパ球が見出され、蠕虫感染における自然免疫応答に重要な役割を果たすことが報告されたので後述したい<sup>7)</sup>。

### Ⅲ. 寄生虫に対する獲得免疫応答

寄生虫を含む病原体に対する防御免疫には、さまざまな要素が関与するが、そのなかでも特にCD4陽性ヘルパーT細胞(Th)が重要な役割を果たす。抗原に未曝露のナイーブCD4陽性細胞が、樹状細胞などの抗原提示細胞(antigen presenting cells; APCs)上の主要組織適合抗原(major histocompatibility complex; MHC)上に提示される病原体由来ペプチドを認識し活性化すると、Th1およびTh2という二つの異なる性格を持つ細胞群に分化していく。寄生虫感染の観点からは、Th1細胞がインターフェロン(IFN-)  $\gamma$  を産生することにより、マクロファージなどの食細胞を活性化し、細胞内寄生性原虫の排除に関与する一方で、Th2細胞はインターロイキン(IL-)4や13などのサイトカインを産生することにより、杯細胞や粘膜肥満細胞の分化や増殖を誘導し、杯細胞から産生されるムチンや粘膜肥満細胞からのケミカルメディエーターの放出は、腸内に寄生する蠕虫の排除に関わる。IL-4はB細胞(形質細胞)による抗体産生やそのクラススイッチを制御してIgEの産生を誘導し、Th2サイトカインの1つであるIL-5は好酸球を誘導する。近年になってTh1/Th2と性質を異にする新規ヘルパーT細胞集団、制御性T細胞

(regulatory T cells; Treg)とTh17が同定された。Tregは過剰な炎症が惹起されないように免疫制御に機能する細胞集団であり、Th17は、炎症誘導に関わるIL-17を産生し、好中球の遊走を介して細胞外病原体の排除に関与することが報告されている。

### Ⅳ. 原虫に対する感染防御機構

マラリア malaria, トリパノソーマ類によるアフリカ睡眠病 sleeping sickness や、シャーガス病 chagas' disease, リーシュマニア類による内臓/皮膚/皮膚粘膜型リーシュマニア症 leishmaniasis, アメーバ赤痢 amoebiasis, ジアルジア症 giardiasis などが、原虫により引き起こされる代表的な熱帯感染症として知られている。また、トキソプラズマ症 toxoplasmosis やクリプトスポリジウム症 cryptosporidiasis は、免疫不全患者における日和見感染症として重要である一方、それぞれ先天性感染や水系集団感染を引き起こす病原体としても重要である。

マラリアの原因であるマラリア原虫 *Plasmodium* spp. は蚊媒介性の原虫であり、蚊によって注入されたスポロゾイトは肝臓で無性生殖を行い、血液中にメロゾイトとして放出される。メロゾイトは赤血球に寄生・増殖しつつ、多様な戦略によって宿主の免疫系から巧みに逃れる。各種リーシュマニア症の原因である *Leishmania* spp. はサシチュウバエによって媒介される原虫であり、貪食したマクロファージをすみかとしてファゴライソゾームの中でぬくぬくと増殖する。シャーガス病の病原体であり、サシガメによって媒介される。 *T. cruzi* やトキソプラズマ症の病原体である *T. gondii* はほとんど全ての有核細胞に感染する。 *T. cruzi* はファゴゾームから細胞質に脱出して増殖し、 *T. gondii* はファゴゾームとライソゾームの融合を阻害してファゴゾームの中で増殖する。またクリプトスポリジウム症を引き起こす *Cryptosporidium* spp. は、腸上皮細胞の中で増殖する。上述の細胞内寄生性原虫は、食細胞などに貪食されたのち、その殺菌機構をかいくぐって食

細胞内で増殖し、病原性の発揮につながる。このように、宿主細胞内に寄生し免疫系から巧みに身を隠す原虫に対する感染防御には、自然免疫に引き続きTh1タイプの獲得免疫応答が誘導されることが重要である<sup>6)</sup>。ジアルジア症の病原体である *Giardia intestinalis*, アメーバ赤痢の病原体である *Entamoeba histolytica* は各々ヒトの大腸、小腸の管腔内で栄養体として増殖する細胞外寄生原虫であるが、近年、これら原虫に対する感染防御においても、Th1タイプの獲得免疫が重要であることが示唆されている。

抗原に未曝露のナイーブCD4陽性細胞は、Th1とTh2という異なる性質を持つ二つの細胞集団に分かれることが報告されたのち、その分化機構や生理的役割の詳細が明らかにされてきた。樹状細胞がその細胞膜上に発現するTLRsによって、原虫由来のPAMPsを認識すると、IL-12をはじめとした炎症性サイトカインの産生が誘導される<sup>6)</sup>。IL-12はナチュラルキラー(natural killer; NK)細胞やCD4陽性およびCD8陽性T細胞によるIFN- $\gamma$ 産生を誘導し、さらにTh1細胞群の誘導・維持に重要な役割を果たす。IL-12刺激によりTh1細胞などから産生されるIFN- $\gamma$ は、マクロファージなどに作用して、MHC分子の発現上昇などを介してその抗原提示能を亢進させるほか、誘導性一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase; iNOS)の発現を亢進させ、産生される一酸化窒素の作用などにより、さまざまな細胞内寄生性病原体の排除に関わっている。こうしたT細胞の分化には、サイトカインが重要な役割を果たしており、Th1への分化にはIL-12が必須の役割を担っている。近年、IL-12と類似性を持つサイトカインIL-23、IL-27、およびIL-35が相次いで同定され、IL-12がサイトカインファミリーをなすことが明らかになった。IL-12ファミリーサイトカインは、いずれもTh1分化を誘導する作用を持つ一方で、一部は免疫抑制作用を持つことが明らかになってきた<sup>8)</sup>。

前述のように、IL-12はNK細胞やTh1細胞によるIFN- $\gamma$ の産生や、CD8陽性T細胞の活性化を誘導し、IFN- $\gamma$ によるマクロファージの活性化は細

胞内寄生性原虫の排除に働く。マクロファージに寄生し、そのファゴライソゾームの中で増殖する *Leishmania* 原虫の排除には、このIFN- $\gamma$ が決定的な役割を果たす。筆者らは、*L. major* 感染早期のTh1分化誘導において、IL-12に先駆けてIL-12ファミリーに属するIL-27/WSX-1が重要な役割を果たすことを示した<sup>9)</sup>。また、*Leishmania* 原虫に対する感染防御においては、IL-12に加えてIL-23も防御的に働くことが示されている。IL-12の重要性は、マクロファージに選択的に寄生する *Leishmania* 原虫に対してだけでなく、多様な細胞に感染する *T. cruzi* や *T. gondii* の感染においても示された<sup>8)</sup>。近年、IL-23は、IL-17やIL-22を産生するTh17細胞の増殖因子であることが判明した。IL-17は *T. gondii* 感染においては好中球の遊走を通して、*T. cruzi* 感染においては炎症性サイトカイン産生増強を通して、感染防御に貢献することが報告された<sup>10)</sup>。感染時にTh1細胞などによって産生されるIFN- $\gamma$ は、宿主にとって諸刃の剣であり、病原体を排除するとともに自らに致命的な炎症を引き起こしうる。免疫制御性サイトカインIL-10、TGF- $\beta$ ならびにIL-27は、炎症性サイトカインの産生抑制を通して、*T. cruzi* や *T. gondii* 感染における過剰な炎症の制御、ひいては生体防御に機能している<sup>11, 12)</sup>。アフリカ睡眠病やナガナ病を引き起こす住血原虫 *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. b. brucei* や *T. evansi* に対しても、IL-12は、IFN- $\gamma$ の産生誘導を介して感染防御に機能している。マラリアの場合、マラリア原虫は肝細胞の中で増殖する赤外型と、赤血球の中で増殖する赤内型をとりうるが、いずれの場合もIL-12が、IFN- $\gamma$ の産生誘導を介して感染防御に機能する。ただし、前述のように、マラリアにおいてIL-12/IFN- $\gamma$ は、原虫排除のみならず自己の組織破壊をもたらすこともあり、*Plasmodium berghei* ANKAによって引き起こされる脳炎や、*P. berghei* NK65による肝炎は、IL-12/IFN- $\gamma$ によって引き起こされることが知られている。*C. parvum* は腸管上皮細胞に感染する細胞内寄生原虫であり、小児や免疫不全状態にある人に下痢を引き起こす日和見病原体である。この

*Cryptosporidium* に対する感染防御機構の詳細は、未だ十分には理解されていないものの、IL-12, IFN- $\gamma$  の重要性については繰り返し報告されている。また、腸管に寄生する細胞外寄生原虫である赤痢アメーバ *E. histolytica* に対する感染防御においても、IFN- $\gamma$  が防御的に働くと報告されている。

CD4陽性T細胞に加えて、NK細胞、CD8陽性T細胞や抗体が、効果的に機能する場合も知られている。ほとんど全ての有核細胞に感染する *T. cruzi* や *T. gondii* に対してはNK細胞、CD8陽性T細胞が防御的に働く。肝細胞で増殖する赤外期のマラリア原虫に対してはCD8陽性T細胞が機能し、赤血球に寄生している赤内期マラリア原虫に対しては抗体が有効である。アフリカ睡眠病やナガナ病を引き起こす住血原虫 *T. b. rhodesiense*, *T. b. brucei* や *T. evansi* に対しても抗体が効果的であるが、マラリア原虫もトリパノソーマも、遺伝子上に変異に富む表面抗原を多数コードしているために、抗体による防御はなかなかうまく機能しない。赤痢アメーバの糖鎖認識レクチンに対するIgAは、赤痢アメーバの腸管内定着を阻害すると考えられている。

## V. 蠕虫に対する免疫応答と感染防御機構

蠕虫が経皮もしくは経口感染すると、蠕虫は目的臓器を目指して体内を移行する。蠕虫に感染すると宿主はしばしばTh2反応を惹起するが、蠕虫感染においてTh2反応が誘導される機序の詳細は、未だに解明されていない。原虫や細菌、ウイルスと違って蠕虫由来の抗原はPAMPsに乏しく、Th1タイプの獲得免疫を誘導する炎症性サイトカインIL-12の産生誘導が低いことが要因かもしれない。蛔虫、鉤虫、糞線虫や糸状虫など、幼虫が体内を移行する蠕虫感染では、幼虫の分泌(excretory-secretory; ES)抗原に対してTh2反応が誘導されるし、住血吸虫の感染では同吸虫の虫卵抗原に対してTh2の免疫応答が誘導される。蠕虫には、Th1タイプの獲得免疫を誘導するPAMPsが乏しいばかりではなく、住血吸虫卵か

ら分泌される糖タンパク質 omega-1 のように強力なTh2誘導活性を示す分子を有するのかもしれない<sup>13)</sup>。蠕虫の体表を覆うchitinにもTh2誘導活性があることが知られている<sup>14)</sup>。いずれにしても、Th2反応が誘導されることは蠕虫感染に比較的共通した現象であり、IL-4依存性の高IgE血症や、IL-5依存性の好酸球増多は蠕虫感染を示す臨床所見の1つである。Th2応答の誘導・増強に機能する細胞集団として好塩基球が注目されていたが<sup>15)</sup>、本年、fat-associated lymphoid cluster (FALC) が新たに同定・報告された。FALCに存在するc-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>細胞は蠕虫感染やIL-33に反応して、大量のTh2サイトカインを産生する新規のnon-T non-Bリンパ球であり、ナチュラルヘルパー細胞と命名された<sup>8)</sup>。このc-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>細胞の病態生理における役割の解明は、蠕虫感染のみならずアレルギー疾患などTh2応答によって特徴付けられる病態の理解を、より一層深めると期待される。

## VI. 寄生虫感染における制御性T細胞の役割

寄生虫は宿主の防御免疫からのエスケープ機構を有する。その中には感染細胞や自然免疫系細胞に免疫抑制性サイトカインであるIL-10や、TGF- $\beta$  の産生を誘導する場合や、Tregなど制御性細胞群を誘導して免疫抑制に働く場合など、過剰な炎症を抑制する免疫制御機構を逆手にとるものがある<sup>9)</sup>。近年、寄生虫感染におけるTregの役割が解明されてきた。ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* XL株(致死株)の感染において、Tregを除去すると免疫抑制が解除され、宿主は原虫を排除して生存することができる<sup>16)</sup>。またヒトの糸状虫 *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* によって引き起こされるフィラリア症では、Tregによって宿主の免疫応答が著しく抑制されるなど、ある条件下ではTregによる免疫制御が感染防御の阻害に繋がることが示された。一方、マンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* 感染動物では、制御性T細胞を除去すると肝障害が亢進するなど、このTregによる制御機構が十分に機能しない場合、過剰な免疫応答が自己組織のダメージへと繋がる

ことが報告されている。制御性T細胞の機能を人為的に操作し、治療へ応用することで、これらの問題を克服することが可能となるかもしれない。

### おわりに

Th1/Th2という性質の異なるヘルパーT細胞サブセットの発見、およびTh1分化を誘導するIL-12の発見により、細胞内寄生性病原体に対する防御免疫におけるTh1/IL-12/IFN- $\gamma$ の重要性が広く認識されてきた。また、近年IL-12関連サイトカインが相次いで同定され、さらにTh17やTregなどの新しいCD4陽性細胞サブセットが同定されたことで、ヘルパーT細胞の分化と免疫制御におけるその役割の理解は、新しい局面を迎えている。一方、FALCとFALCに存在するナチュラルヘルパー細胞(c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>細胞)が蠕虫感染におけるTh2応答に果たす役割が明らかになることに伴い、蠕虫をはじめとした寄生虫に対する免疫応答の研究も、大きく展開することが期待される。

### 参考文献

- 1) Stoll NR : This wormy world. *J Parasitol* 1947 ; 33 : 1~18.
- 2) Bethony J, et al. : Soil-transmitted helminth infections : ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet* 2006 ; 367 : 1521~1532.
- 3) 濱野真二郎 : 寄生虫による病気 家庭の医学 第6版. 2008 ; 1523~1535.
- 4) 宮入慶之助記念誌編纂委員会編 : 住血吸虫症と宮入慶之助 —ミヤイリガイ発見から90年—. 九州大学出版会, 2005 ; 1~290.
- 5) 山内一也, 北 潔 : 〈眠り病〉は眠らない—日本発! アフリカを救う新薬. 岩波書店, 2008 ; 1~128.
- 6) Gazzinelli RT, Denkers EY : Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways : implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 2006 ; 6 : 895~906.
- 7) Moro K, et al. : Innate production of Th2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> lymphoid cells. *Nature* 2010 ; 463 : 540~544.
- 8) 吉田裕樹, 濱野真二郎 : 原虫感染とIL-12サイトカインファミリー. 蛋白質 核酸 酵素 ; 2009 ; 54 : 1059~1065.
- 9) Yoshida H, et al. : WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. *Immunity* 2001 ; 15 : 569~578.
- 10) Miyazaki Y, et al. : IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2010 ; 185 : 1150~1157.
- 11) Hamano S, et al. : WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 2003 ; 19 : 657~667.
- 12) 小林隆志 ほか : 感染症制御における制御性T細胞. *アレルギー・免疫* 2009 ; 16 : 708~714.
- 13) Steinfeld S, et al. : The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *J Exp Med* 2009 ; 206 : 1681~1690.
- 14) Reese TA, et al. : Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* 2007 ; 447 : 92~96.
- 15) Yoshimoto T, et al. : Basophils contribute to Th2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 2009 ; 10 : 706~712.
- 16) Hisaeda H : Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Med* 2004 ; 10 : 29~30.



# トキソプラズマ、増殖の 仕組み

## ◆キーワード

トキソプラズマ  
細胞内寄生  
内生2分裂  
植物ホルモン  
アブシジン酸

国立感染症研究所寄生動物部 \*主任研究官

青沼 宏佳 (あおぬまひろか) 田原美智留 (たはらみちる)

\*永宗喜三郎 (ながむねきさぶろう)

## はじめに

トキソプラズマ原虫は非常にpopularな病原微生物である。日本では人口の20〜30%、フランスでは80%以上の人が感染していると言われている。多くの感染者にとって、トキソプラズマ感染は不顕性に経過するが、一方でトキソプラズマ感染症は一度発症すると非常に重篤な感染症となる。

また、トキソプラズマはすべての温血動物(哺乳類および鳥類)のすべての有核細胞に感染能を持っていると言われている。そして

多くの場合、原虫は宿主に何ら症状を起こさず不顕性感染として宿主に一生寄生し続けることができる。本稿ではこのようなトキソプラズマのユニークな形質のうち、特に増殖に関わる最新の知見を紹介していきたい。

## トキソプラズマの寄生メカニズム

トキソプラズマ虫体の頂端(apical)には宿主細胞に侵入する際に機能する複雑(complex)な頂端複合物“apical complex”が存在する。apical complexには、マイクロネ

ーム、ロプトリー、デンス・グラニユールと呼ばれる分泌器官が開口しており、これらから分泌される分子は細胞侵入と細胞内生存のために重要な役割を果たしている。寄生過程において、原虫はまず宿主細胞表面をグライディングと呼ばれる独特な機構により移動し、宿主細胞にその尖端部を付着させる。マイクロネームから分泌されるタンパク質群は、細胞外原虫の宿主細胞への侵入に接着分子として役立つ(図1、左)。

宿主接着後、原虫は活発に宿主細胞膜を陥入しながら宿主細胞内

に入っていく(図1、中)。侵入自体は通常20秒以内で完了する。この侵入は、ウイルスや細菌などのような宿主によるエンドサイトーシスではなく、原虫由来のグライディング運動によるものである。また侵入時に原虫は、宿主との接点においてムービング・ジャンクションと呼ばれる構造を形成する。この部分において、原虫は未知のメカニズムにより宿主の膜タンパク質を選択的に排除することが知られている。そして最終的に、原虫は宿主内において寄生胞と呼ばれる特殊化された区画内に存在している状態となる(図1、右)。

デンス・グラニユールからのタンパク質分泌は、侵入中や侵入終了後に起こり、寄生胞内の修飾に関与していると考えられている。寄生胞内で増殖した原虫は、最終的に宿主細胞を破壊して脱出し、次の細胞へ再び侵入していく。

これらのトキソプラズマ由来の分泌タンパク質群のうち、ロプトリーから分泌されるタンパク質群は宿主細胞機能を修飾し、細胞内を原虫の生存に適した環境に改変

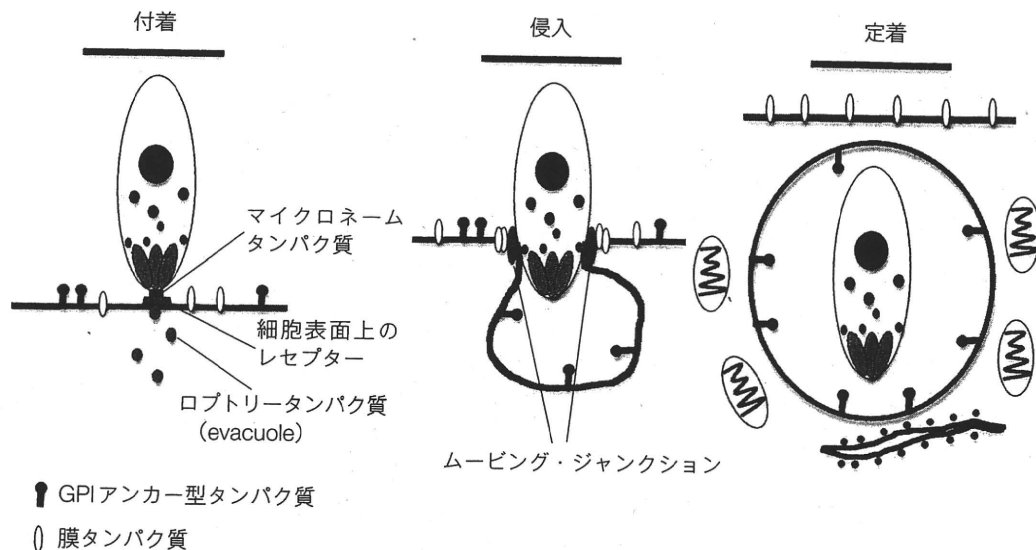


図1 トキソプラズマの細胞侵入機構

宿主細胞に付着した原虫はevacuoleとしてロプリータンパク質を注入する。一方で原虫自身はマイクロネームタンパク質により細胞表面上のレセプターと結合し、侵入を開始する。

侵入中に原虫は宿主との接点にムービング・ジャンクションと呼ばれる構造を形成し、原虫はそこで寄生胞に取り込むべき宿主タンパク質と、排除すべきものを選別すると考えられている。原虫は宿主細胞侵入後も宿主細胞や寄生胞の修飾を続け、自身の周りを増殖に適した状態へと変えていく。

する能力を持つと言われており、非常にユニークな存在である。ロプリータンパク質の分泌は、原虫の宿主侵入に先立ち、独立した小胞(evacuole)として原虫から宿主細胞に注入される。evacuole内のロプリータンパク質のうちの一部は後に寄生胞膜に融合され、原虫—宿主間の相互作用に関与する。一方で、ロプリータンパク質群の中には、寄生胞に輸送される以外に宿主の核に輸送される一群の存在が知られている。

これらのタンパク質群はキナーゼドメインを持っており、宿主のタンパク質をリン酸化すると考えられているが、その詳細は未だ不明である。また、これらのロプリータンパク質のうち、ROP16やROP18はトキソプラズマの病原性を規定する因子であることが知られている<sup>1)2)</sup>。

### 内生2分裂

トキソプラズマを含むアピコンプレクス門の原虫は、きわめて複雑で珍しい分裂様式を取る。それは、内生2分裂(endodyogeny)である。

ある。内生2分裂の最大の特徴は、「一つの細胞質の中に」娘細胞が二つ形成されるといふ点にあり、動物、植物、カビや細菌などに見られる一般的な2分裂とは大きく性質を異にしている<sup>3)</sup>。

トキソプラズマ(図2)の内生2分裂はゴルジ体の分裂で開始する。ゴルジ体は母細胞内で伸長し、まだ娘細胞の形が定まらないうちに二つに分裂する(図2b)。ゴルジ体の伸長と同時に、アピコンプレクス門原虫に独特の細胞内小器官であるアピコプラストも伸長するが、分裂はせず娘細胞の足場が形成される時を待つ(図2b)。また中心体は、ゴルジ体の分裂と同時に分裂し、その後アピコプラストの伸長と並行して、娘細胞が構築される予定位置へと移動することが知られている。

このような第一段階とも言える小器官分裂の後、ようやく娘細胞構築の骨組みの形成が行われる。後に娘細胞の細胞内小器官はこの骨組みに基づいて分配される。娘細胞形成の足場はinner-membrane complex (IMC) の膜系

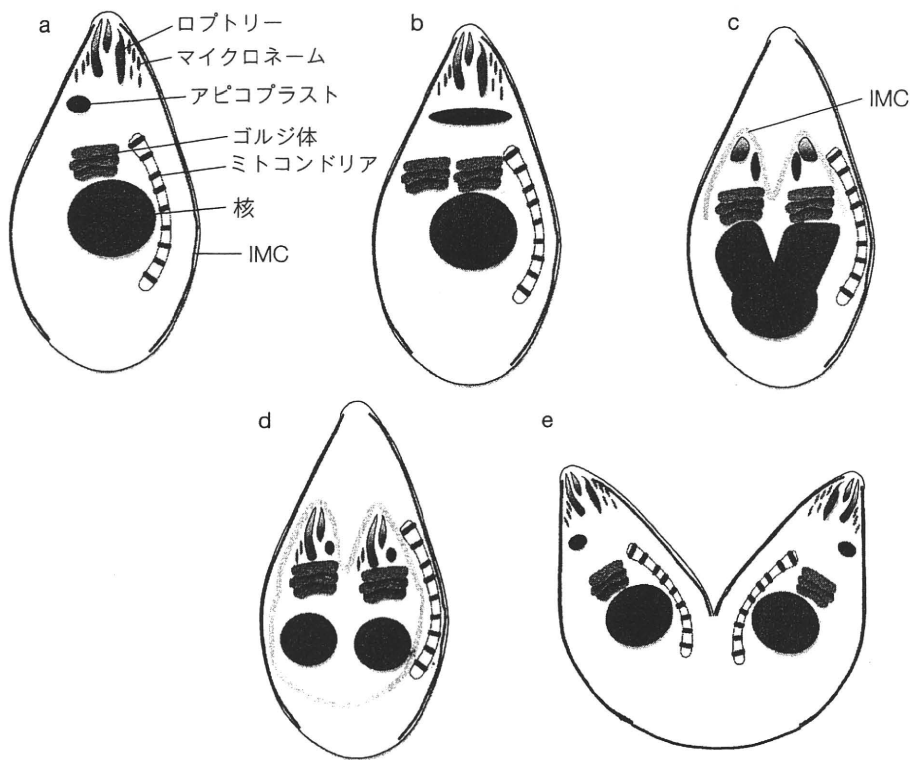


図2 トキソプラズマの内生2分裂

a: 間期. b: 分裂開始. アピコプラストが伸長し, ゴルジ体は分裂する. c: 娘細胞のIMCが形成され始め, アピコプラストが分裂, 分配される. 親細胞の分泌器官であるロプトリーやマイクロネームは消失し, 娘細胞の頂端部に新たに形成される. 核内DNAが複製され分配される. d: 親細胞内に2つの娘細胞が形成される. この段階になって初めてミトコンドリアの分配が始まる. e: 親細胞は融解, 消失し, 分裂が終了する.

であり, 娘細胞の頂端部となる部分から順に母細胞内に構築されていく(図2c)。IMCによる足場の構築が始まると, アピコプラストの分裂が起こり, 中心体とともに娘細胞に分配される(図2c)。

一方, 核ではすでにDNAの複製が行われており, アピコプラストの分裂とほぼ同時に核が分裂することにも明らかにされている。その際に哺乳動物をはじめとする多くの真核動物で見られるような核膜の消失や, 紡錘体の形成による染色体の分配は行われず, 核は核膜に包まれたまま娘細胞に分配される(図2c)。この時, 小胞体も核膜に連合して核とともに娘細胞に分配される。

以上のように, 細胞内小器官の多くは母細胞の小器官が分裂することによって娘細胞に分配されるが, 娘細胞には新規に形成される小器官も存在する。それは, マイクロネームとロプトリーである(図2a)。これらの小器官は, 娘細胞に新たに形成され, その形成と同時に母細胞の同小器官は消失する(図2c)。

そして, 最後に娘細胞に分配される小器官がミトコンドリアである。トキソプラズマのミトコンドリアは, 娘細胞の足場であるIMCが伸長し, 他の小器官が娘細胞に分配されつつある間は娘細胞に分配されることなく, 母細胞側から娘細胞を囲っている(図2d)。そして, 娘細胞の分裂の完成と同時に娘細胞側に取り込まれて分配される(図2e)。この一連の経過を経て, 一つの母細胞中に二つの娘細胞が形成され, 内生2分裂は終結する。

このような内生2分裂について,



これまでに興味深い現象も示されてきた。例えば、真菌症の薬として知られるイトラコナゾールが、トキソプラズマの内生2分裂を阻害し、その増殖を抑制することが報告されている<sup>4)</sup>。イトラコナゾール処理したトキソプラズマでは、分裂異常から生じる形態異常が観察される。すなわち、母細胞中に形成された娘細胞の最終分離が正

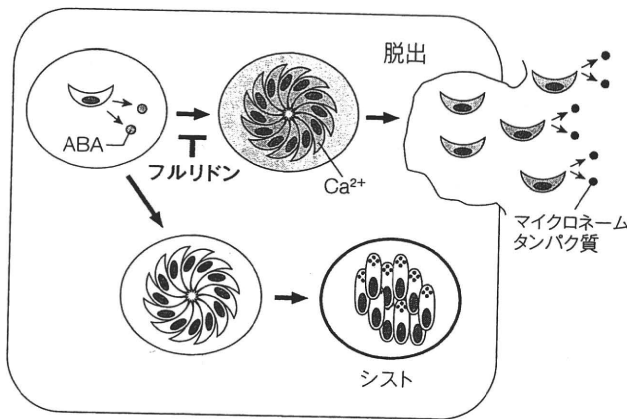


図3 植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) がトキソプラズマに及ぼす影響

ABAの蓄積が原虫細胞質内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、原虫は宿主細胞からの脱出やマイクロネームタンパク質の分泌を開始する。フルリドンはアブシジン酸の生合成を阻害し、原虫の脱出を抑制しシストへの分化を促進させる。

### トキソプラズマとアブシジン酸 (ABA)

筆者らは最近、トキソプラズマが植物ホルモンの一種であるアブシジン酸 (ABA) を産生し、原虫はこのホルモンにより自身の増殖を調節していることを見出した<sup>5)</sup>。ABAは植物ではセカンドメッセンジャーである cyclic ADP-ribose (cADPR) の産生依存的に細胞質内へのカルシウム放出を引き起こすことが知られている。このABAをトキソプラズマ原虫に添加すると、原虫の運動や宿主細胞への侵入に重要な役割を持つ、マイクロネームタンパク質の分泌が誘導された。

また筆者らはすでに、マイクロネームタンパク質の分泌はcADPR依存的な原虫細胞質内カルシウム濃度の上昇に依存していることを見出していたので、実際にABA添加後に原虫の産生するcADPRを測定したところ、加えたABA量に依存して有意に上昇していた。また、このABAによるマイクロネームタンパク質分泌は細胞質内

カルシウム濃度の上昇に依存していることが確認できた。

さらに筆者らは Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) や MS 解析により、トキソプラズマ原虫が実際にABAを産生していることを証明した。ABA濃度は、原虫が宿主細胞から脱出する直前に急激に上昇していた。MS/MS解析により、トキソプラズマ原虫は trans型および cis型の両方のABAを産生していることが示された。宿主細胞内の原虫に、外部からABAを加えると、原虫の宿主細胞からの脱出が誘導された。

また、植物においてABA生合成の特異的阻害薬であることが知られているフルリドンは、トキソプラズマ原虫においてもABA産生を阻害した。そこで原虫の培養をフルリドン処理すると、トキソプラズマ原虫は加えたフルリドンの濃度依存的に宿主細胞からの脱出が阻害された。しかしながら、この阻害は外部からのABA添加によって相補できた。これらのことからABAは原虫にとって、宿

主細胞からの脱出のシグナルにな  
っている可能性が考えられた。

以上の結果から、トキソプラズ  
マ原虫はA B Aを産生しており、  
A B Aは原虫内でカルシウム放出  
のセカンドメッセンジャーである  
CADPR産生を誘導し、細胞質内  
カルシウム濃度を上昇させ、宿主  
細胞からの脱出やそれに伴うグラ  
イディングと次の宿主細胞への侵  
入を促進するという一連のシグナ  
ルの存在が示唆された(図3)。

また、A B A生合成阻害薬フル  
リドンの培養中への添加によりA  
B Aの生合成を阻害すると、原虫  
のシストへの分化が誘導された  
(図3)。

フルリドンは一方で、マウスを  
用いたトキソプラズマ感染実験に  
おいて、マウスの致死率を有意に  
減少させた。このことは、A B A  
生合成の阻害が原虫の宿主細胞か  
らの脱出を抑制することによる感  
染拡散の阻止の結果であると推定  
できた。この結果、フルリドンが  
哺乳動物に対し毒性が弱く、除草  
剤として用いられている事実と合  
わせて考えると、フルリドン、あ

るいはA B A生合成阻害薬が抗ト  
キソプラズマ薬開発の良いリード  
化合物となる可能性を示唆する。

### おわりに

以上の例から明らかのように、  
最近の分子生物学、細胞生物学の  
発展によりトキソプラズマの増殖  
機構の一端が明らかにされ、その  
独自の生物学に注目が集まりつつ  
ある。トキソプラズマはマラリア  
の原因となるマラリア原虫と同じ  
アピコンプレクス門に分類され、  
共通の事象も多い。トキソプラズ  
マはマラリア原虫と比べ、分子生  
物学的、細胞生物学的解析が容易  
であることから、マラリア原虫を  
はじめとする他のアピコンプレク  
ス門原虫のモデルとしても注目さ  
れつつある。

□□文 献□□

- 1) Saeij JP, et al : Nature 445 : 324, 2007.
- 2) Taylor S, et al : Science 314 : 1776, 2006.
- 3) Nishi M, et al : J Cell Sci 121 : 1559, 2008.
- 4) Martins-Duarte Edos S, et al : FEMS Microbiol Lett 282 : 290, 2008.
- 5) Nagamune K, et al : Nature 451 : 207, 2008.

# トキソプラズマが産生する植物ホルモン

\* 国立感染症研究所 寄生動物部  
永宗喜三郎

## 1. トキソプラズマ症

トキソプラズマ原虫はほとんどの温血動物の全ての有核細胞に感染能を持ち、全人類の1/3以上、日本人の約25～30%が感染しているといわれている非常に広く蔓延している寄生性原生生物である。多くの感染者にとって、トキソプラズマ感染は不顕性に経過するが、一方でトキソプラズマ感染症は一度発症すると非常に重篤な感染症となる。1999年アメリカCDCからの報告の中では、トキソプラズマ症は、food borne diseaseによる全入院患者のうち原因の明らかになったものの4.1% (第4位)、死者数においては20.7% (第3位)にもなると推定されている<sup>1)</sup>。また、トキソプラズマ原虫はHIV感染者に致死的な脳炎を引き起こして患者を死に至らしめることが知られており、アメリカでの統計によるとHIV感染患者の18～25%がトキソプラズマ脳炎を発症することが報告されている<sup>2)</sup>。一方1999年WHOからの報告によると<sup>3)</sup>、1998年の全世界の総死者数の25%を占める感染症による死者のうち、17.3%がAIDSを原因として亡くなっていることと合わせて考えると、世界中の感染症による死者の約4%はトキソプラズマ感染症が原因で亡くなっていると思積もることも

可能である。

## 2. 植物としてのトキソプラズマ

トキソプラズマが属する、アピコンプレクス門に属する原虫には現在5,000種以上が知られており、全てが寄生性の原生動物である。この中にはマラリア原虫やトキソプラズマ、クリプトスポリジウムなど人類にとって大きな脅威となっている感染症が含まれている<sup>1, 3)</sup>。これらアピコンプレクス門に属する原虫の大きな特徴の1つとして、アピコプラストと呼ばれるオルガネラの存在が挙げられる。アピコプラストは葉緑体が退化してできた四重膜構造の細胞内小器官であり、通常の葉緑体は光合成細菌が植物の祖先に取り込まれて進化したものとされているが、アピコプラストは光合成細菌を取り込んだ紅藻類の祖先が原虫の祖先生物に取り込まれることによって成立したと考えられている(図1)。そのために、アピコプラストは独特の四重膜構造をとる。現在ではアピコプラストは光合成能を失ったものの、脂肪酸合成などの機能を今でも担っており、したがって原虫にとって必須のオルガネラである。しかしながらその機能の詳細は不明であり、何故原虫の生存に必須なのかもはっきりとはわかっていない。いずれにしても、アピコンプレクス

門原虫の細胞内には植物が「組み込まれている」ということは今やよく知られている事実となっている。

## 3. トキソプラズマとアブシジン酸

著者らは最近、トキソプラズマが植物ホルモンの一種であるアブシジン酸を産生し、原虫はこのホルモンにより自身の増殖を調節していることを見出した<sup>4)</sup>。アブシジン酸は高等植物ではセカンドメッセンジャーであるcyclic ADP-ribose (cADPR)の産生依存的に細胞質内へのカルシウム放出を引き起こすことが知られている。このアブシジン酸をトキソプラズマに添加すると、原虫の運動や宿主細胞への侵入に重要な役割を持つ、マイクロネームタンパク質の分泌が誘導された。著者らは既に、マイクロネームタンパク質の分泌はcADPR依存的な原虫細胞質内カルシウム濃度の上昇に依存していることを見出していたので<sup>5)</sup>、実際にアブシジン酸添加後に原虫の産生するcADPRを測定したところ、加えたアブシジン酸量に依存して有意に上昇していた。また、このアブシジン酸によるマイクロネームタンパク質分泌は細胞質内カルシウム濃度の上昇に依存していることが確認できた。

更に我々はELISAやMS解析により、トキソプラズマ原虫が実際に

アブシジン酸を産生していることを証明した。また、宿主細胞内の原虫に外部からアブシジン酸を加えると、原虫の宿主細胞からの脱出が誘導された。更に、植物においてアブシジン酸生合成の特異的阻害剤であることが知られているフルリドンは、トキソプラズマにおいてもアブシジン酸産生を阻害した。そこで原虫の培養をフルリドン処理すると、トキソプラズマは加えたフルリドンの濃度依存的に宿主細胞からの脱出が阻害された。またこの阻害は外部からのアブシジン酸添加によって相補できた。これらのことからアブシジン酸は原虫にとって、宿主細胞からの脱出のシグナルになっている可能性が考えられた。また、アブシジン酸生合成阻害剤フルリドンの培養中への添加によりアブシジン酸の生合成を阻害すると原虫のシストへの分化が誘導された。以上の結果から、トキソプラズマ原虫はアブシジン酸を産生しており、アブシジン酸は原虫内でカルシウム放出のセカンドメッセンジャーであるcADPR産生を誘導し、細胞質内カルシウム濃度を上昇させ、宿主細胞からの脱出やそれに伴う運動と次の宿主細胞への侵入を促進するという一連のシグナルの存在が示唆された(図2)。

フルリドンは一方で、マウスを用いたトキソプラズマ感染実験におい

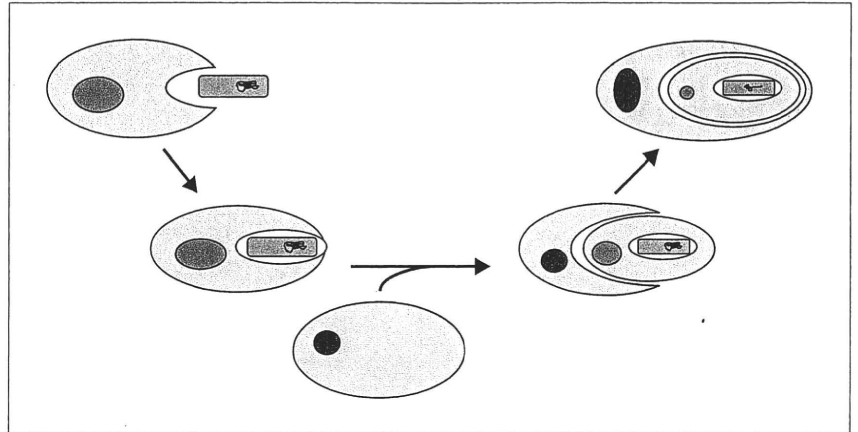


図1 アピコプラストの成立機序

通常の葉緑体は光合成細菌(緑)が植物の祖先(水色)に取り込まれて進化したものとされているが、アピコプラストは光合成細菌を取り込んだ紅藻類の祖先が原虫の祖先生物(赤)に取り込まれることによって成立したと考えられている。そのために、アピコプラストは独特の四重膜構造をとる。

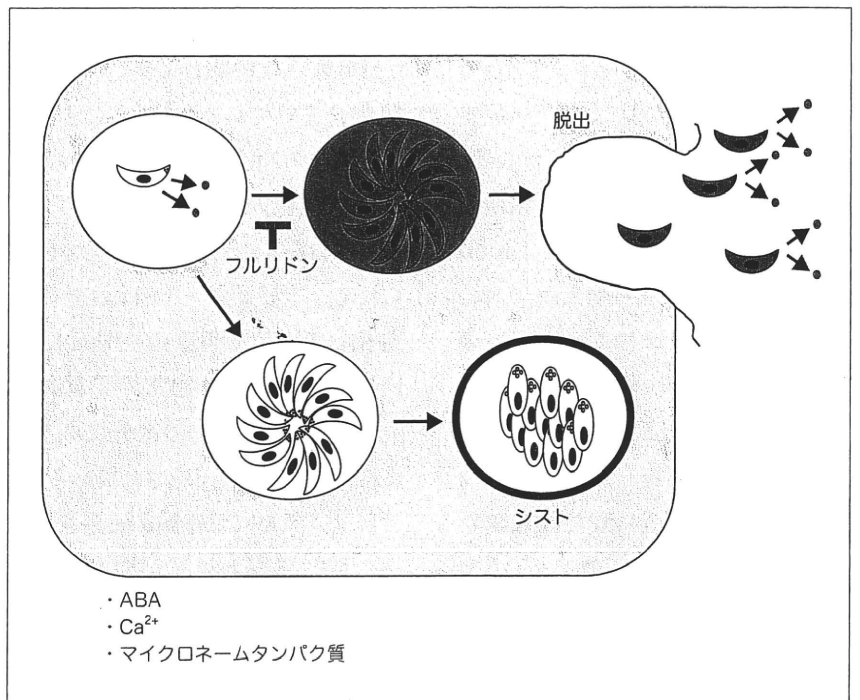


図2 植物ホルモンであるアブシジン酸がトキソプラズマ原虫に及ぼす影響

アブシジン酸(ピンク)の蓄積が原虫細胞質内カルシウム(青)濃度の上昇を引き起こし、原虫は宿主細胞からの脱出やマイクロネームタンパク質(緑)の分泌を開始する。フルリドンはアブシジン酸の生合成を阻害し、原虫の脱出を抑制しシストへの分化を促進させる。

て、マウスの致死率を有意に減少させた。この結果はフルリドンが哺乳動物に対し毒性が弱く、除草剤として用いられている事実と合わせて考えると、フルリドン、あるいはアブ

シジン酸生合成阻害剤は抗トキソプラズマ薬開発のいいリード化合物となる可能性が示唆された。