Biological Significance of Glycosylphosphatidylinositols in Protozoan Parasites

原生動物寄生虫におけるグリコシルホスファチジルイノシトールの生物学的意義

Garg, Nisha

Department of Cellular Biology, 724 Biological Sciences Building, The University of Georgia, Athens,
Georgia 30602, USA, FAX: 1-706-542-4271, E-mail: ngarg@cb.uga.edu

Key Words : biosynthesis, glycosylphosphatidylinositol, infectivity and survival, inhibitors, protozoans

Abstract

Parasitic protozoans including the members of trypanosomatidae family are the cause of diseases in humans and livestock. A majority of the glycoproteins present on plasma membrane of these parasites are attached by glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor. In addition, plasma membrane of some of the protozoans is decorated with free GPIs which are not attached to proteins. The structure and biosynthesis of GPIs in protozoans as compared to higher eukaryotes and their utility as targets for anti-protozoan chemotherapy is discussed. The crucial role of GPIs and GPI-attached glycoproteins in protozoan parasites infectivity and survival is the focus of this review.

A. Introduction

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors attach a diverse group of macromolecules to the plasma membrane of eukaryotes. In "higher" eukaryotes, GPIs are found on a minor group of proteins. In kinetoplastids, a majority of the cell surface proteins are GPI-anchored. Parasitic protozoans including members of the trypanosomatidae family (*e.g.* African trypanosomes, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp.*), *Toxoplasma*, *Plasmodium*, and *Theileria* cause diseases in humans and livestock. GPI-attached glycoproteins in these organisms have been implicated in a number of biological processes related to parasitism and pathogenesis. In addition, the plasma membrane of some of the parasitic protozoans is decorated with GPIs that are not attached to proteins. Our current understanding of the biosynthesis of GPIs, and their possible function in protozoan parasites physiology, infectivity and virulence will be the focus of this review. Detailed discussion of the structure and biosynthesis of GPIs in protozoans, yeast and mammalian cells can be found in several recent reviews (1-8).

要約

Trypanosomatidae 族を含む寄生性原生動物は、人、家畜の病気の原因である。これら寄生虫の原形質膜に存在している糖タンパク質の大部分は、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI)-アンカーにより膜に結合している。加えて何種類かの原生動物の原形質膜は、タンパク質に結合していないフリーな GPI で修飾されている。高等な真核生物と比較して原生動物での GPI の構造と生合成、また原生動物に対する化学療法のターゲットとしての GPI の利用についても述べたい。原生動物の寄生虫が感染したり生存していく際の GPI と、GPI のついた糖タンパク質の役割の重要性について述べるのが、この論文の中心である。

A. はじめに

グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーは、マクロな分子の多様なグループを、真核生物の原形質膜につなぎとめている。高等な真核生物において、GPI はマイナーなタンパク質であると見られている。kinetoplastid では、細胞表面タンパク質の大部分が GPI アンカー型である。trypanosomatidae 族 (例えば African trypanosomes, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp.*), *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Theileria* を含む寄生性原生動物は、人、家畜の病気の原因である。これら生物における GPI 結合型糖タンパク質は、寄生と病因に関連した、多くの生化学プロセスに関係している。加えて、いくつかの寄生虫の原生動物の原形質膜は、タンパク質のついてない GPI で修飾されている。GPI 生合成に関して今わかっているところ、原生動物寄生虫の生理学、感染、毒性に関する機能が、この論文の中心となろう。原生動物、yeast、哺乳類細胞での GPI の構造と生合成についての詳しい議論は、いくつかの最近の論文 (1-8) を参照されたい。

Abbreviations used: AEP, aminoethylphosphonic acid; CTL, cytotoxic T lymphocytes; EtNP, phosphoethanolamine; GIPL, glycoinositolphospholipid; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GlcN, glucosamine; GP63, *Leishmania* protease; GPI, glycosylphosphatidylinositol; LPG, lipophosphoglycan; LPPG, lipopeptidophosphoglycan; Man, mannose; PARP, *Trypanosoma brucei* procyclic acid protein; PI, phosphatidylinositol; PI-PLC, PI-specific phospholipase C; VSG, variant surface glycoprotein.

B. Structure of GPI Anchors

The first protozoan GPI structure was elucidated in *T. brucei* (9, 10). Since then GPIs have been characterized from *Leishmania* (11–13), *T. cruzi* (14–16), *Plasmodium* (17, 18), *Toxoplasma* (19, 20) and yeast (21, 22).

All GPI anchors share a “conserved core” glycan (Man α 1-4GlcN α 1-6PI) constituted of mannose (Man), glucosamine (GlcN) and phosphatidylinositol (PI). In protein-GPIs, the core is extended by the addition of two mannose residues in α 1-6 and α 1-2 linkages (Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN-PI) (10). The 6-OH group on the third mannose from the reducing end is attached to phosphoethanolamine (EtNP) (10). Nevertheless, all the known anchors except that of the *L. major* gp63 (13, 23) have various substituents (3). An additional α -mannose extension of the tri-mannosyl core present in *T. cruzi* 1G7-GPI anchor (*i.e.* Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN-PI) (24) is also common in *P. falciparum*, yeast and mammalian GPIs. Incorporation of aminoethylphosphonic acid (AEP) in place of EtNPO₄ occurs in some *T. cruzi* GPIs (16, 25). GPIs with acylation of the 2-OH group of the inositol ring are present on some proteins (*e.g.* PARP of *T. brucei* (26) and Tc-85 in *T. cruzi* (27)). The conserved GPI core in *T. gondii* tachyzoites is modified by addition of β -linked N-acetylgalactosamine residue(s) (28).

The lipid moieties of GPIs exhibit striking diversity depending upon the developmental stage or species of the parasites. Diacylation of a glycerophospholipid moiety is common, but an ether linkage at the sn-1 position of a glycerol backbone is not rare (13, 14, 29). For example, dimyristoylglycerol is found on VSG-GPI in *T. brucei* (9), whereas sn-1-alkyl-2-acylglycerol is present on the GPI of gp63 of *Leishmania* (13) and 1G7 of *T. cruzi* (14). Ceramide may be used in place of the glycerolipid as the source of alkyl groups. In *T. cruzi*, inositol phosphoceramide is detectable in 10% of 1G7 (14), 70% of metacyclic mucins (15, 16) and in amastigote Ssp-4 (30).

Free GPIs, and GPIs attached to polysaccharides are expressed on the plasma membrane of some parasitic protozoans. Lipophosphoglycan (LPG) of *L. donovani* consists of a linear chain of phospho-disaccharide repeat units (-6Gal β 1-4Man α 1-HPO₄)_n (n=15–30) linked to the plasma membrane by a heptasaccharide core consisting of Gal α 1-6Gal α 1-3Gal β 1-3(Glc α 1-HPO₄-6)Man α 1-3Man α 1-4GlcN α 1-6myo-Ins-1-HPO₄-(sn-1-alkyl-2-lyso-glycerol) (31–33). Glycoinositol phospholipids (GIPLs) identified in *L. major* and *L. donovani* amastigotes contain the conserved glycan core (Man α 1-4GlcN α 1-6PI) and are classified based upon the presence of second mannose residue in α 1-6 (Type 1), α 1-3 (Type 2) or branched (Man α 1-6(Man α 1-3, hybrid GIPLs) conformation (34–37). Lipopeptidophosphoglycan (LPPG) of *T. cruzi* contains a Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN glycan with additional β Gal β residues (β 1-3 linkage on Man_{3,4}), 2-AEP on the 6-

B. GPIアンカーの構造

初期の原生動物のGPI構造は、*T. brucei*で解明された(9、10)。それ以来、GPIは*Leishmania*(11–13)、*T. cruzi*(14–16)、*Plasmodium*(17、18)、*Toxoplasma*(19、20)、yeast(21、22)で調べられている。

すべてのGPIアンカーは、マンノース(Man)、グルコサミン(GlcN)、ホスファチジルイノシトール(PI)からなる、「保存されたコア」と呼ばれる糖鎖(Man α 1-4GlcN α 1-6PI)を持つ。タンパクGPIにおいては、 α 1-6、 α 1-2結合(Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcNPI)した2つのマンノース残基が結合してコアが伸びる(10)。還元末端から、3つ目のマンノースの6-OH基が、ホスファチジルエタノールアミン(EtNP)に結合している(10)。その一方で、*L. major* gp63を除いて(13、23)、知られているすべてのアンカーは、さまざまに置換されている(3)。トリマンノシル化したコアに α -マンノースが付加することで伸長した構造が、*T. cruzi* 1G7-GPIアンカー(Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN-PI)(24)に存在しており、*P. falciparum*、yeast、哺乳類のGPIにも共通である。いくつかの*T. cruzi* GPIでEtNPO₄の位置にアミノエチルホスホニル酸(AEP)が結合している(16、25)。イノシトール環の2-OH基がアシル化したGPIは、いくつかのタンパク質に存在している(例えば*T. brucei*(26)のPARPと*T. cruzi*のTc-85)。*T. gondii* tachyzoiteの保存されたGPIコアは、 β 結合したN-アセチルグルコサミン残基の付加により修飾される(28)。

GPIの脂質部分は、発達段階や寄生虫の種に依存した際だった多様性を示す。グリセロリン脂質はジアシル化されている場合が一般的であるが、グリセロール骨格のsn1位のエーテル結合もまれというわけではない(13、14、29)。例えば、ジミリスチルグリセロールは*T. brucei*(9)のVSG-GPIで見られ、それに対し、sn-1-alkyl-2-acylglycerolは、*Leishmania*(13)のgp63のGPIと*T. cruzi*(14)の1G7のGPIで存在する。セラミドは、アルキル鎖の供給源としてグリセロ脂質の代わりに使われているようだ。*T. cruzi*において、イノシトールホスホセラミドは、1G7の10%(14)、metacyclic mucins(15、16)、amastigote Ssp-4(30)の70%に見られる。

フリーなGPIと多糖のついたGPIは、何種かの原生動物の寄生虫の原形質膜上に発現している。*L. donovani*のリボホスホグリカン(LPG)は、Gal α 1-6Gal α 1-3Gal β 1-3(Glc α 1-HPO₄-6)Man α 1-3Man α 1-4GlcN α 1-6myo-Ins-1-HPO₄ (sn-1-alkyl-2-lyso-glycerol)(31–33)からなる7糖コアにより原形質膜に結合しており、直鎖のリン酸化2糖の繰り返し単位(-6Gal β 1-4Man α 1-HPO₄)_n(n=15–30)からなる。*L. major*と*L. donovani* amastigoteで確認したグリコシルイノシトールリン脂質(GIPLs)は、保存された糖コア(Man α 1-4GlcN α 1-6PI)を含み、また、 α 1-6(Type1)、 α 1-3(Type2)での2番目のマンノース残基の存在や枝分れした(Man α 1-6とMan α 1-3が混ざったGIPLs)構造に基づいて分類される(34–37)。*T. cruzi*のリボペプチドリン酸化糖(LPPG)は、付加した β Galフラノース残基(Man3-4に β 1-3結合している)、GlcNの6位で2-AEP、アルキルグリセロールの代わりにセラミドを結合したMan α 1-2Man α 1-

Fig. 1. Pathways of glycosylphosphatidylinositol (GPI) biosynthesis in kinetoplastids and mammalian cells. Biosynthesis of GPIs as depicted in trypanosomes (*T. brucei* and *T. cruzi*) and *Leishmania* is compared to mammalian cells. Abbreviations used are, AEP, aminoethylphosphonic acid; EtNP or E, phosphoethanolamine; FA, fatty acid; GIPL, glycoinositolphospholipid; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GlcN or G, glucosamine; GPI, glycosylphosphatidylinositol; LPG, lipophosphoglycan; LPPG, lipopeptidophosphoglycan; M, mannose; PI, phosphatidylinositol.

position of GlcN, and ceramide instead of alkylacylglycerol (38–40).

C. GPI Biosynthesis

GPI biosynthesis was first studied in a *T. brucei* cell free system (Fig. 1). Since then, GPI biosynthesis in other protozoans (19, 41), mammalian cells (42–44) and yeast (45) has been described (Fig. 1).

The first two steps in GPI biosynthesis are common to all biological systems. Transfer of N-acetylglucosamine (GlcNAc) to PI utilizing UDP-GlcNAc as the activated donor, to form GlcNAc-PI, is followed by deacetylation to form GlcN-PI (46). Based upon the experiments done using intact microsomes prepared from trypanosomes or mammalian cells, these reactions appear to occur on the cytoplasmic side of endoplasmic reticulum (ER) (47). Sensitivity to cytosolic phospholipase C of Dol-P-[³H]Man incorporation into GPI precursors in vitro to form Man₃-GlcN-PI in *T. brucei* membranes further (48) suggests that GPI intermediates are predominantly localized on the cytosolic ER membranes. EtN-phospho-Man₃-GlcN-PI is also detected on the cytoplasmic leaflet of ER membranes in *T. brucei* (48). The completed GPI synthesized cytosolically appears to flip into the ER lumen where its transfer to protein occurs. A protein GPI transamidase (PGTase) then catalyzes GPI addition to protein (49–51).

2Man α 1-6Man α 1-4GlcN glycanを含む(38–40)。

C. GPI生合成

GPI生合成は最初*T. brucei*のcell free systemで研究された。それ以来他の原生動物(19、41)、哺乳類細胞(42–44)、そしてyeast(45)でのGPI生合成が報告されてきている(図1)。

GPI生合成の最初の2つのステップは、すべての生物システムに共通である。GlcNAc-PIを作るため、活性供与体としてUDP-GlcNAcを用いて、PIにN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を転移し、続いてGlcN-PIを作るために脱アセチル化する(46)。Trypanosomeあるいは、哺乳類細胞から用意した無傷のミクロソームを使って行った実験に基づく、これらの反応は小胞体(ER)の細胞質側で起こるようだ(47)。

*T. brucei*膜(48)でMan₃-GlcN-PIを作るため、*in vitro*でDol-P-[³H]ManがGPIプレカーサーに結合したときの細胞質のホスホリパーゼCに対する感受性から、GPIの中間体は細胞質側のER膜に局在されていることがわかる。EtN-phospho-Man₃-GlcN-PIはまた、*T. brucei* (48)ではER膜の細胞質側にみられる。完全に合成されたGPIは、ERの内腔へflip-flopされ、そこでタンパク質へ転移する。その時GPIトランスアミダーゼ(PGTase)が、GPIがタンパク質へ付加するのを触媒する(49–51)。

Compartmentalization of GPI biosynthetic pathways is of interest where more than one type of GPI is found in a cell. *Leishmania* for example contains polysaccharide GPIs, protein GPIs and GIPLs. The in vivo sensitivity of GPI precursors to stably expressed *T. brucei* GPI-PLC has been used to study the compartmentalization of protein and polysaccharide-GPI biosynthesis in *Leishmania* (52, 53). GPI-PLC is localized to the cytoplasmic side of intracellular membranes where it might cleave the GPI precursors if they co-localize with the enzyme. Reduced surface expression of GPI anchored proteins in GPI-PLC expressing *Leishmania* suggested that protein-GPI biosynthesis occurs on cytosolic side of the ER. Polysaccharide-GPIs were not depleted by the enzyme, indicating lumenal topology of LPG biosynthesis (52, 53). In agreement with this proposal, *LPG1* gene product involved in LPG biosynthesis is oriented lumenally (54).

A number of genes encoding enzymes involved in GPI biosynthesis have been cloned by complementation of the mammalian and yeast mutants. These genes include *PIG-A*, *PIG-B*, *PIG-C*, *PIG-F*, *PIG-H*, *PIG-L* from mammalian cells and *GPI1*, *GPI2*, *GPI3/SPT14*, *GAA1*, *GPI8* genes from yeast (55–63). Three gene products are required for the first biosynthetic step in both mammalian cells (*PIGA*, *PIGC* and *PIGH*) and yeast (*gpi1*, *gpi2*, *gpi3*). *PIGL* is required for conversion of GlcNAc-PI to GlcN-PI. Accumulation of mature GPI-precursors which do not attach to proteins in *GPI8* defective T lymphoma cells (51, 64, 65) or yeast mutants (50)) and *GAA1* defective yeast mutants (58) indicate a role of these gene products in GPI addition to protein.

The predicted properties of the polypeptides encoded by GPI biosynthetic genes confirm the cytoplasmic orientation of these reactions. *PIG-A*, *PIG-C*, *PIG-H*, and *PIG-L* encode proteins that lack a signal peptide for translocation in the ER lumen. Some of the encoded proteins have also been localized to cytosolic membranes (57, 60, 66, 67).

GPI lipid remodeling may take place either before or after attachment to the protein. Such remodeling is well documented in *T. brucei* (68), *T. cruzi* (30, 69) *Leishmania* (70) and yeast (71–73). Two types of lipid modifications have been described in kinetoplastids: remodeling and denovo exchange. Remodeling of GPI precursors before attachment to proteins, as documented in *T. brucei* involves sequential replacement of fatty acids at sn-2 and sn-1 position with myristic acid (68). Replacement of alkyl-acyl moiety with ceramide on $\text{Man}_{3,4}\text{-GlcN-PI}$ provides precursors for LPPG biosynthesis in *T. cruzi* (16). A process similar to fatty acid remodeling *i.e.* fatty acid exchange is also described in trypanosomes. VSG attached GPI has been suggested to undergo a regular exchange of myristate with myristate donated by myristoyl-CoA (74, 75). Though process of myristate exchange and lipid remodeling is suggested to occur in different compartments, functional significance of the fatty

1種類以上のGPIが細胞内で見られる点で、GPI生合成経路の局在の仕方は興味深い。例えば、*Leishmania*は多糖GPI、タンパク質GPI、そしてGIPLを含む。常に存在する*T. brucei* GPI-PLCに対するGPIプレカーサーのin vivoでの感受性は、*Leishmania* (52, 53)でのタンパクの分類と多糖GPI生合成を研究するのに使われてきた。GPI-PLCは、細胞内膜の細胞質側に位置し、もしGPIプレカーサーが酵素と一緒にあればそれを分解する。GPI-PLCを発現している*Leishmania*でGPIアンカータンパク質の表面発現が減っていることは、タンパクGPI生合成が、ERの細胞質の細胞質側で起こることを示唆する。多糖GPIは酵素によって量的に低下しないことから、LPG生合成(52, 53)は内腔に位置していることを示している。LPG生合成に関与しているLPG1遺伝子産物は、内腔に配向しているという事実が、この考えを裏付けている(54)。

GPI生合成に関与する酵素をコードしている多くの遺伝子は、哺乳類とyeast変異株の相補性を用いてクローン化された。これらの遺伝子には哺乳類細胞からの、*PIG-A*、*PIG-B*、*PIG-C*、*PIG-F*、*PIG-H*、*PIG-L*が含まれ、yeastからの*GPI1*、*GPI2*、*GPI3/SPT14*、*GAA1*、*GPI8*遺伝子が含まれる(55–63)。3つの遺伝子産物は、哺乳類細胞(*PIG-A*、*PIG-C*、*PIG-H*)とYeast(*gpi1*、*gpi2*、*gpi3*)の両方において最初の生合成ステップで必要である。*PIG-L*は、GlcNAc-PIからGlcN-PIへ変換するのに必要である。*GPI8*が欠損したTリンパ腫細胞(51, 64, 65)、*GAA1*が欠損したyeast変異株(58)で、タンパク質についていない成熟型GPIプレカーサーがたまるのは、これら遺伝子産物の役割がGPIをタンパク質へ付加することであるとわかる。

GPI生合成遺伝子がコードするポリペプチドの予想された性状により、これらの反応が細胞質側に存在することが確認される。*PIG-A*、*PIG-C*、*PIG-H*、*PIG-L*は、小胞体内腔で転移に必要なシグナルペプチドを持たないタンパク質をコードしている。コードされるタンパク質のいくつかは、細胞質膜に局在している(57, 60, 66, 67)。

GPIの脂質のリモデリングは、タンパク質につく前か後のどちらかで起こるようだ。そういったリモデリングは、*T. brucei* (68)、*T. cruzi* (30, 69)、*Leishmania* (70)、yeast (71–73)で十分証明されている。2種類の脂質修飾リモデリングと*de novo*交換が、kinetoplastidで述べられてきた。*T. brucei*で証明されるようにタンパク質につく前のGPIプレカーサーのリモデリングは、sn-1とsn-2位で脂肪酸がミリスチン酸へ、連続して置換する(68)。 $\text{Man}_{3,4}\text{-GlcN-PI}$ でのアルキルアシル部のセラミドへの置換より、*T. cruzi*(16)でLPPGでの生合成のプレカーサーができる(16)。脂肪酸リモデリングすなわち脂肪酸交換に類似したプロセスが、Trypanosomeでもまた述べられている。GPIの付いたVSGは、ミリスチル-CoA (74, 75)により供給されるミリスチル酸でミリスチル交換を受けると言われてきた。ミリスチル交換と脂質リモデリングのプロセスは、異なったコンパートメントでおこるといわれているけれども、脂肪酸交換が機能的に

acid exchange remains unknown.

Despite the similarity in the GPI biosynthetic pathway in various organisms, several unique features have been observed in mammalian cells as compared to protozoans (Fig. 1). For example, acyl-CoA dependent acylation of the inositol ring to produce GlcN-(acyl)PI is obligatory before mannosylation can proceed in yeast and rodent cells (45, 72, 76, 77). Inositol acylation is not a pre-requisite for mannosyl or EtNP transferases of protozoans (41, 78). Thus, mannosyl transferase(s) of *T. brucei* may have different substrate specificity than the enzymes catalyzing a similar function in yeast and mammalian cells. The enzymes responsible for inositol acylation and deacylation in *T. brucei* are sensitive to phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and diisopropylfluorophosphate (DFP) respectively (79), whereas enzymes with similar activity in mammalian cells are unaffected (80). Mature free GPIs with acylated inositols though absent in *Leishmania* (41) and *P. falciparum* (17) are present in abundance in *T. brucei* (78, 81) and *T. gondii* (82). However, transfer of these mature, inositol-palmitoylated GPIs to proteins as documented in mammalian cells (76, 83) and yeast (73) remain undetected in protozoans.

Identification of natural or synthetic molecules differentially recognized by the GPI biosynthetic machinery of yeast and mammalian cells or protozoans (84, 85) confirms the fact that GPI biosynthetic pathway is significantly different between protozoans and higher eukaryotes. This presents the possibility of utilizing GPI-biosynthesis as a target for anti-protozoan chemotherapy. Acquisition of detailed information on biochemical and structural properties of GPI biosynthetic enzymes may provide knowledge for rational design of chemotherapeutic agents capable of specifically blocking the growth of the pathogenic protozoans.

D. Functional Importance of GPIs

Proteins which are attached to GPI anchors include hydrolases, signal transducers, receptors, ligands, cell adhesion molecules and coat proteins, *i.e.* they vary extensively in their function. In addition, free GPIs or polysaccharide-GPIs of protozoans may have roles in parasite growth, virulence and survival. Detailed discussion of the function of GPIs in mammalian cells is presented in some recent reviews (7, 86). In this review, I will focus on the function of GPIs in protozoan parasites (Tables I, II).

D-1. Attachment to, Invasion of, and Survival in Mammalian Hosts

GPI anchored macromolecules play important roles in the survival of protozoan parasites in mammalian cells. In *Leishmania*, gp63 and LPG have been recognized as virulence factors. *Leishmania* promastigotes deficient in gp63 exhibit reduced infectivity of macrophages *in vitro* (87, 88) as well as *in vivo* (89, 90). GP63 is proposed to enable the promastigotes to

どう重要であるかはわかっていない。

さまざまな生物でGPI生合成経路は似ているにもかかわらず、原生動物と比較して哺乳類細胞では、いくつかの際だった特徴が見つかった(図1)。GlcN-acyl-PIを合成するためのイノシトール環でのacyl-CoA依存性アシル化は、yeast、齧歯動物細胞でマンノシル化が起こる前には必須の過程である(45、72、76、77)。一方イノシトールアシル化は、原生動物のマンノシルあるいはEtNPトランスフェラーゼにとっては必須のものではない(41、78)。従って、*T. brucei*のマンノシルトランスフェラーゼはyeastと哺乳類細胞において、類似した機能を触媒する酵素であるが、異なった基質特異性を持つのかも知れない。

*T. brucei*のイノシトールアシル化と脱アシル化の原因である酵素は、フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)とジイソプロピルフルオロフォスフェイト(DFP)のそれぞれに感受性である一方で、哺乳類細胞での類似した活性をもつ酵素は影響を受けない。アシル化されたイノシトールを持つフリーな成熟型GPIは、*Leishmania* (41)、*P. falciparum* (17)にはないけれども*T. brucei*(71、81)と*T. gondii* (82)に豊富に存在する。これらの成熟型イノシトールパルミトイル化GPIが、タンパク質へ転移するというのは哺乳類細胞とyeastで証明されている。しかしながら、原生動物では見つけられていない。

yeast、哺乳類細胞、原生動物(84、85)のGPI生合成機構により、天然や合成の分子が異なって認識されることで、GPI生合成経路は原生動物と高等な真核生物の間では大きく異なることが確かめられている。このことは、原生動物に対する化学療法のターゲットとしてGPI生合成を利用できることを示す。GPI生合成酵素の生化学的、構造的特性に関する詳しい情報を得ることで、病原性を持つ原生動物の成長を特異的に止めるのに利用できる化学療法試薬を、合理的にデザインできる知識を与える可能性がある。

D. GPIの機能的な重要性

GPI アンカー化されているタンパク質には、ハイドロラーゼ、シグナルトランスデューサー、リセプター、リガンド、細胞付着分子、コートタンパク質などがある。言ってみれば、それらは、機能的に大きく異なっている。加えて原生動物のフリーなGPIや、多糖GPIは、寄生虫の成長、毒性、生存において役割をもつかも知れない。哺乳類細胞でのGPIの機能は、いくつかの最近の論文で述べられている(7、86)ので、この論文では、原生動物寄生虫でのGPIの機能を中心に述べる(表I、II)。

D-1. 哺乳類宿主への接着、進入、生存

GPIアンカーのマクロ分子は、哺乳類細胞において原生動物の寄生虫が生存するのに重要な役割を果たす。*Leishmania*において、gp63、LPGはvirulence因子と考えられていた。*Leishmania* promastigoteでのgp63欠損は、*in vivo* (89、90)だけでなく、*in vitro* (87、88)でもマクロファージの感染性を下げる。GP63は、

Table I. Some of the GPI-anchored proteins in parastic protozoans.

Parasite species	Proteins	Stage of expression	Properties/Function
<i>Trypanosoma brucei</i>	Variant surface glycoprotein	Blood-form trypomastigotes	Coat glycoprotein/antigenic variation
	Transferrin binding protein complex	-do-	Transferrin uptake
	Procyclin/PARP	Procyclics	coat glycoprotein
<i>Trypanosoma cruzi</i>	GP50/55	Epimastigotes	
	gp35/50 kDa mucins	Metacyclics	Sialic acid acceptor, attachment & invasion
	C10	-do-	invasion
	1G7	-do-	Major surface glycoprotein, invasion
	Ssp-3	Trypomastigotes	Sialic acid acceptor, attachment & invasion
	Trypomastigote surface antigen (TSA-1)	-do-	Trans-sialidase family member
	Trans-sialidase	-do-	Transfers sialic acid from host to parasite membranes, intracellular escape from lysosomes
	GP-85 family	-do-	Trans-sialidase family (inactive proteins)
	FL-160	-do-	160 kD flagellar antigen
	TCNA/Shed acute phase antigen (SAPA)	-do-	Trans-sialidase family (inactive proteins)
	Amastigote surface protein ASP-1,	Amastigotes	Trans-sialidase family member
	Ssp-4	-do-	Major surface glycoprotein
<i>Leishmania sp.</i>	Promastigote surface protease (GP63)	Promastigotes	Major glycoprotein, promastigote adhesion and invasion of macrophages, complement resistance,
	GP46	-do-	
	PSA-2	-do-, Amastigotes	
<i>Plasmodium falciparum</i>	Circumsporozoite protein (CSP-1)	Sporozoites	
	Merozoite surface protein (MSP-1, MSP-2, MSP-4)	Merozoites	Major surface glycoproteins
	Transferrin binding protein	-do-	
	proteinase (p76)	-do-/Schizonts	
<i>Toxoplasma gondii</i>	P22, P23, P30, P35, P43	Tachyzoites	Major surface glycoproteins
<i>Crithidia fasciculata</i>	Protease		GP63 homologue

withstand complement mediated lysis (90). GP63 promotes the binding of promastigotes to macrophage by its direct interaction with macrophage complement receptor type 3, Mac-1 (91, 92) and the fibronectin receptor (93). In addition, gp63 is the primary acceptor for C3 deposition (94). Proteolytic conversion of surface bound C3b, by gp63 to iC3b (95, 96) which is a better ligand for Mac-1 promotes parasite adhesion to and invasion of macrophages (97).

The major surface glyco-conjugate of *Leishmania*, LPG, facilitates promastigote attachment to the midgut of the sand fly insect vector (98, 99). LPG is modified during metacyclogenesis (the maturation of non-infective promastigotes to infective metacyclic promastigotes) by capping of terminal β -gal residues and elongation of the phospho-disaccharide (PO4-6Gal(β 1-4)Man(α 1-)) repeats (100). This modified LPG serves as a ligand for attachment of metacyclics to host macrophages. The receptor binding domain of LPG is the phospho-disaccharide repeat (99, 101). LPG also contributes to provide resistance to complement mediated lysis of metacyclics (102, 103). LPG deficient *Leishmania* promastigotes exhibit reduced virulence (104, 105)

promastigoteが補体による分解に抵抗できるようにすると言われる。GP63は、マクロファージ補体リセプター-type3、Mac-1 (91、92)やフィブロネクチンリセプター(93)と直接に相互作用することで、promastigoteがマクロファージへ結合するのを促進する。加えて、gp63は、C3沈着の最初のアクセプターである(94)。そしてgp63が、細胞表面に結合したC3bをタンパク分解により変換することで、Mac-1よりよいリガンドであるiC3b (95、96)を作りだし、寄生虫の接着とマクロファージへの侵入を促進する(97)。

*Leishmania*の重要な表面多糖体であるLPGは、promastigoteが媒介昆虫であるsand flyの中腸にくっつくのを促進する(98、99)。LPGは、metacyclogenesis (非感染性promastigoteから感染性metacyclic promastigoteへの成熟過程のこと)の間に末端 β -gal残基のキャッピングとホスホジサッカライド(PO4-6Gal(β 1-4)Man(α 1-))の繰り返し(100)の伸長によって修飾される。この修飾LPGは、宿主マクロファージに対するmetacyclicの結合のリガンドとして役立つ。LPGのリセプター結合ドメインは、ホスホジサッカライドの繰り返し(99、101)部である。LPGは、また補体によるmetacyclicの溶解に抵抗するのに役立つ(102、103)。LPG欠損*Leishmania* promastigoteは、virulencyが減少している(104、105)。

Table II. Function of glycosylphosphatidylinositols in parasitic protozoans.

Function	Parasite species	GPI molecule
Promastigote adhesion and invasion of macrophages	<i>Leishmania</i>	LPG
Metacyclics adhesion to macrophages	<i>Leishmania</i>	LPG
Surface glycocalyx lateral mobility	<i>T. brucei</i>	VSG-GPI
Complement resistance	<i>Leishmania</i>	LPG, GIPL
	<i>T. brucei</i>	VSG-GPI, PARP-GPI
Activation of macrophages, cytokines secretion and iNOS synthesis	<i>T. brucei</i> , <i>P. falciparum</i>	GPI
	<i>T. cruzi</i>	trypomastigote-mucin-GPI
Activation of protein tyrosine kinase	<i>T. brucei</i> , <i>P. falciparum</i> , <i>Leishmania</i>	GPI
Activation of protein kinase C	<i>T. brucei</i> , <i>T. cruzi</i> , <i>P. falciparum</i>	GPI
Inhibition of macrophage function, iNOS synthesis	<i>Leishmania</i>	GIPLs, LPG
Inhibition of protein kinase C	<i>Leishmania</i>	LPG, GIPL
Growth and replication	<i>T. cruzi</i> ,	GPI
	<i>Leishmania</i>	GIPL
Virulence	<i>T. cruzi</i>	GPI
	<i>Leishmania</i>	GIPL

which could be partially regained by *ex vivo* treatment with LPG (106) or LPG complementation (107). LPG mutants of *L. major* (with 10-fold reduced expression of LPG), compared to wild-type parasites, are avirulent in mice (108).

Several different, predominantly stage specific GPI-anchored proteins are reported to be involved in attachment, invasion and intracellular escape of *T. cruzi*. Examples include 1G7 (gp90) (109), gp82 (110) and 35/50 kDa mucins (111, 112) of metacyclic trypomastigotes, Ssp-3 (113), gp-85 (114) of blood-form trypomastigotes and possibly Ssp-4 of amastigotes (115). Pre-treatment of metacyclics with anti-1G7 (116) or anti-gp35/50 (111, 117) antibodies or trypomastigotes with anti-Ssp-3 (118, 119) or anti-Tc85 (114, 120) antibodies inhibits invasion *in vitro* and neutralizes infection in mice. One interpretation of these data is that multiple *T. cruzi* ligands are involved during establishment of an infection. Nevertheless, verification of these observations awaits genetic studies.

Sialylation of parasite GPI anchored proteins might be important for invasion of host cells by *T. cruzi*. Transfer of sialic acid from host donor molecules to *T. cruzi* 35/50 kDa mucins (121) and Ssp-3 (122) is catalyzed by a trans-sialidase which is itself GPI anchored. Sialylation of parasite surface molecules appears to correlate with the invasive capability of *T. cruzi*, as removal of sialic acid from mammalian cells with glycosidases (123), masking of surface carbohydrate moieties of fibroblasts (124), or the use of sialic acid deficient mutant Lec-2 cells (125, 126) results in a reduction in invasion by *T. cruzi*. However, the lack of complete blockage of invasion in the above mentioned experimental models and in a GPI deficient isolate of *T. cruzi* (127) suggest that non-sialylated ligands might also be important in attachment and invasion of *T. cruzi*.

The binding of *T. cruzi* trypomastigotes to host cells is

それは、外からLPG (106)を処理したり、LPGを補うことにより回復する(107)。*L. major*のLPG変異株(LPGの発現が10分の1に減っている)はwild typeの寄生虫と比較して、ねずみに対しvirulentではない(108)。

いくつかの異なった stage 特異的GPIアンカータンパク質は、*T. cruzi*の接着、侵入、細胞内逃避に必要とされている。これらの例としてmetacyclic trypomastigoteの1G7(gp90) (109)、gp82 (110)、35/50kDa ムチン(111、112)、血流型 trypomastigote のSsp-3 (113)、gp85 (114)、amastigote のSsp-4 (115)が含まれている。抗1G7(116)や抗 gp35/50 抗体(111、117)でmetacyclicを前処理したり、抗Ssp-3(118、119)、抗Tc85(114、120)抗体で trypomastigote を処理すると、ねずみで、*in vitro*での侵入を阻害し、感染を中和する。これらのデータに対する1つの説明として、感染成立中には複数の*T. cruzi* リガンドが関与していることがあげられる。しかし、これらの結果の確認には遺伝的研究が必要である。

寄生虫GPIアンカータンパク質のシアル酸化は、*T. cruzi*が宿主細胞に侵入するのに重要であろう。宿主ドナー分子から、*T. cruzi* 35/50kDaのムチン(121)とSsp-3 (122)へシアル酸を転移するのは、GPIアンカー化されたシアル酸転移酵素により触媒される。グリコシダーゼにより哺乳類細胞からのシアル酸の除去(123)、フィブロブラストの表面の炭水化物部分のマスキング(124)、シアル酸欠損変異株のLec-2 cell (125、126)の使用は、*T. cruzi*が、侵入するのを結果的に減らすので、寄生虫表面分子のシアル酸化は、*T. cruzi*の侵入に関連しているようだ。しかしながら、上で述べた、実験モデルと*T. cruzi* (127)の単離したGPI欠損株において、侵入を完全にブロックできないのは、シアル酸化されていないリガンドもまた、*T. cruzi*の接着と侵入において重要である可能性を示唆している。

T. cruzi trypomastigoteの宿主細胞への結合に続いて、寄生虫

followed by Ca^{2+} influx and the gradual fusion of host lysosomes with plasma membrane at the site of parasite attachment. Lysosomal fusion provides the membrane required for parasite entry and vacuole formation (128–130). The trypomastigote stage 120-kDa peptidase (115) and metacyclic stage mucin-like GPI-anchored proteins C10 (131) and gp35/50 (112) have been proposed to initiate Ca^{2+} flux and probably lysosome clustering through different mechanisms. Once inside the lysosomal vacuole, removal of sialic acid from the lysosomal membrane by *T. cruzi* trans-sialidase glycoprotein facilitates vacuole disruption by a hemolysin like molecule and release of *T. cruzi* into the host cell cytoplasm. At the same time, parasites protect themselves from the hydrolytic enzymes of lysosome by sialylation of their own surface *via* trans-sialidase reaction (132, 133).

In African trypanosomes, VSG is the major coat protein. Densely packed VSG dimers and α -galactosyl chains of the GPI anchor (134, 135) occupy most of the cell surface of the bloodstream form trypomastigotes. VSG-GPI has been proposed to provide lateral mobility to the protein and assist in the creation of a macromolecular diffusion barrier by close packaging of its galactosyl side chain to the parasite plasma membrane (4, 136). This arrangement of VSG might minimize the access of host defense proteins (*e.g.* antibodies) to underlying antigens on the parasite plasma membrane (4, 136). VSG itself is highly immunogenic, however the *T. brucei* population survives the host immune responses by antigenic variation wherein the coat protein is regularly replaced by a different VSG (137).

The surface of procyclic stages of *T. brucei* is dominated by PARP. The PARP-GPI anchor has a complex side chain containing N-acetylglucosamine, glucose and sialic acid residue (138) which might also contribute to formation of a dense protective glycocalyx for the insect stage of the parasite. Sialylation of PARP-GPIs contribute to prevention of lysis of *T. brucei* procyclics exposed to complement in insect blood-meal (139).

D-2. Growth and Replication

The abundance of GPIs in kinetoplastid parasites and the variety of biological roles assigned to them suggests that the ability to make GPIs might be critical for the growth and survival of these organisms. This hypothesis is confirmed by the fact that GPI depletion correlates with a growth deficiency in both *Leishmania* and *T. cruzi* (52, 53, 140, Mensa-Wilmot and Garg *et al.* 1998, submitted). The intracellular amastigote stage of these protozoans was especially sensitive to a GPI deficiency. GPI deficient *T. cruzi* amastigotes displayed several phenotypes; including limited replication, lack of differentiation to trypomastigotes, and duplication of the kinetoplast but failure to replicate the cell nucleus (127, 140).

GPI deficient *T. cruzi* and *Leishmania* are less virulent in animal models of Chagas' disease and *Leishmaniasis* (140, Mensa-Wilmot and Garg *et al.* submitted). Thus, GPIs appear to be necessary for maintaining the viability and/or replication

接着部での Ca^{2+} 流入と、血漿膜と宿主リソゾームとのゆっくりとした融合が起こる。リソゾーム融合が寄生虫侵入と小腔形成 (128–130)に必要となる膜を供給する。trypomastigote stage 120-kDaペプチダーゼ(115)、metacyclic stage ムチン様GPIアンカータンパク質C10 (131)、gp35/50 (112)は、 Ca^{2+} 流動とリソゾームのクラスターリングを異なったメカニズムで起こすと言われている。いったんリソゾームの小胞に入ったら、*T. cruzi* trans-sialidase糖タンパク質が、リソゾーム膜からシアル酸を除去することで、hemolysin様分子が小胞破壊を促進し、*T. cruzi*を宿主の細胞質へ放出するのを容易にする。同時に、寄生虫は、シアル酸転移酵素反応によって表面をシアル酸化することで、リソゾームの加水分解酵素より自分を守る(132, 133)。

African trypanosomeにおいて、VSGは主なコートタンパク質である。GPIアンカー(134, 135)のぎっしりつまったVSG二量体と α -ガラクトシル鎖は、血流型trypomastigoteの細胞表面のほとんどをしめる。VSG-GPIは、タンパク質に膜上での横の動きを与え、寄生虫原形質膜をガラクトシル側鎖で閉じこめることにより、マクロ分子拡散バリアーの形成を助ける(4, 136)。このVSGの配列は、寄生虫の原形質膜の下に存在する抗原に、宿主防御タンパク質(抗体)が接近するのを最小にする(4, 136)。VSGはそれ自体高い免疫原性を持つ。しかしながら、*T. brucei*集団は、抗原変化により宿主免疫反応から逃れ、そこで異なったVSGがコートタンパクにとってかわる(137)。

*T. brucei*のprocyclic stageの表面は、PARPがしめている。PARP-GPIアンカーは、N-アセチルグルコサミン、グルコース、シアル酸残基を含む複雑な側鎖を持つ(138)。それは、insect stageの寄生虫にとって密集した保護的糖衣を形成するのに役立つかも知れない。PARP-GPIのシアル酸化は、昆虫 blood meal中の補体により、*T. brucei* procyclicが溶解するのを防止するのに役立つ(139)。

D-2. 成長と複製

kinetoplastidの寄生虫で、GPIが豊富であることと、それらに割り当てられているさまざまな生化学的役割から、GPIをつくるのは、これらの生物の成長と生存には重要であることがわかる。GPIの枯渇が、*Leishmania*と*T. cruzi* (52, 53, 140 Mensa-Wilmot & Gargら1998に提起した)で、成長における欠損と関連しているという事実により、この仮説が確かめられた。これらの原生動物の細胞内のamastigote stageはGPI欠損に特に感受性である。GPI欠損*T. cruzi* amastigoteは、いくつかの表現型をしめしている。例えば、複製ができないもの、trypomastigoteへの分化ができないもの、kinetoplastidの複製はできるが、細胞核の複製はできないものなどがある(127, 140)。

GPI欠損の*T. cruzi*と*Leishmania*は、シャガス病とリーシュマニア症の動物モデルにおいて、ほとんどvirulentでない(140, Mensa-Wilmot & Gargら提起した)。このことからGPIは、これら寄生性原生動物の生存能力と複製を維持するのに必要であるよ

of these parasitic protozoans. These results have important implications for the treatment and prevention of infection with these protozoans: (i) Enzymes in the GPI biosynthesis pathway could be excellent targets for chemotherapeutic interventions; (ii) Protozoans with mutations in the GPI biosynthetic pathway may have utility as "live" vaccines.

D-3. Effect of Protozoan Parasite GPIs on Host Cells

Mammalian hosts frequently respond to the entry of infectious agents by activation of non-specific acute responses. The stimuli provided by foreign molecules (*e.g.* bacterial lipopolysaccharides, carbohydrates, DNA etc.) initiate the activation of macrophages which is primed by interferon- γ (IFN- γ) produced by natural killer (NK) or T cells. Activated macrophages produce tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-12 (IL-12), which act in synergy to stimulate inducible nitric oxide synthase (iNOS) synthesis. iNOS activation results in production of high levels of nitric oxide (NO), which is a major effector molecule against intracellular pathogens (141, 142). In the case of protozoan infections, GPIs and GPI anchored proteins may provide signals for macrophage activation, cytokine release and NO production.

In *T. cruzi* infection, host macrophage function is important in the control of extra-cellular trypomastigotes. Trypomastigote mucin-GPIs are suggested to be the potent inducers of IFN- γ dependent macrophage activation and of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-12) (143) and NO synthesis by activated macrophages (144). Both the glycan as well as the lipid moieties of the trypomastigote mucin-GPIs contribute to macrophage activation and cytokine secretion. Epimastigote or metacyclic mucin-GPIs do not activate macrophages, suggesting that stage specific differences in GPI structure influence the activity of the glycolipids (143).

Malarial parasite and African trypanosome GPIs also induce macrophage and endothelial cell activation and trigger cytokine and NO synthesis (86, 145-147). The phosphoglycan fraction of *Leishmania* LPG has also been shown to induce NO and TNF- α production (148).

In contrast to above examples, GPI anchored macromolecules may also be employed by the protozoans to inhibit macrophage activation. *Leishmania* GPIs and LPGs inhibit IFN- γ dependent macrophage activation, iNOS synthesis and NO output (149-151). A majority of the inhibitory effect is found in the alkylacylglycerol moiety of the GPIs (152). It thus appears that LPGs and GPIs are utilized by *Leishmania* to regulate the expression of iNOS and the leishmanocidal activity of macrophages, thereby promoting the parasite survival.

The activation of protein tyrosine kinase (PTK) is a key signalling step in the regulation of numerous cellular responses including lymphocyte and macrophage activation. Protozoan GPIs are proposed to exert their effect by regulating the PTK mediated activation of lymphocyte and macrophage immune

うに見える。これらの結果は、こういった原生動物の取り扱いや、感染に対しての防御に重要な意味をもっている。つまりGPI生合成経路に関与する酵素は、化学療法にとって、すばらしいターゲットとなりうる。またGPI生合成経路において変異を持つ原生動物は、生きたワクチンとして有用性をもつかもしい。

D-3. 宿主細胞上での原生動物寄生虫の効果

哺乳類宿主は、非特異的な急性反応を活性化することにより感染性病原体の侵入に反応する。異物(例えば、細菌性のリポサッカライド、炭水化物、DNAなど)により刺激を与えると、ナチュラルキラー(NK)やT細胞により作られるINF γ によってマクロファージの活性化が開始される。活性化したマクロファージは、腫瘍壊死因子(TNF- α)とインターロイキン12(IL-12)を作り、それは誘導NOシンターゼ(iNOS)合成を刺激する際に共同作用する。iNOS活性化は、結果的に一酸化窒素(NO)の高レベル産生へとつながり、それは細胞内病原体に対し、主要なエフェクター分子である(141, 142)。原生動物の感染の際、GPIとGPIアンカータンパク質は、マクロファージ活性化、サイトカイン放出、NO産生に対するシグナルを与える可能性もある。

*T. cruzi*感染において、宿主マクロファージ機能は、細胞外のtrypomastigoteのコントロールに重要である。trypomastigoteムチンGPIは、マクロファージ活性化依存性INF γ 、前炎症性サイトカイン(TNF- α とIL-12)(143)、活性化マクロファージ(144)によるNO合成の誘発因子である可能性もある。trypomastigote ムチンGPIの脂質部分だけでなく、グリカンの両方がマクロファージ活性化とサイトカイン分泌に役立つ。EpimastigoteやmetacyclicムチンGPIは、マクロファージを活性化しない。GPI構造での、stage特異的相違が糖脂質の活性化に影響を与えられている(143)。

マラリア寄生虫とAfrican trypanosome GPIは、マクロファージや内皮細胞の活性化、サイトカインを誘発しNOを合成する(86, 145-147)。*Leishmania* LPGのphosphoglycan 分画は、NOとTNF- α 産生を引き起こすことが示されてきた。

上の例と反対に、GPIアンカーマクロ分子は、原生動物によりマクロファージ活性化を阻害するためにも利用される。*Leishmania* GPIとLPGは、マクロファージ活性化依存性INF γ 、iNOS生合成とNO産生を阻害する(149-151)。大部分の阻害効果が、GPIのアルキルアシルグリセロール部分で見られる。LPGとGPIは、iNOSの発現、マクロファージのleishmanocidal活性を調節するために*Leishmania*によって利用されるようだ。それゆえ、寄生虫の生存を助ける。

プロテインチロシンキナーゼ(PTK)の活性化は、リンパ球とマクロファージ活性化を含む多くの細胞反応の調節をする上でかぎとなるシグナルステップである。原生動物GPIは、PTKが媒介したリンパ球とマクロファージの免疫機能活性化を調節する

functions. Purified GPIs from *P. falciparum*, *T. brucei* and *L. major* induce rapid activation of PTK in murine macrophages and in human vascular endothelial cells (86, 147, 152). The minimal structure required for PTK activation is Man₃-GlcN-Ins-phospho-lipid (86, 152). However, PTK activation by Man₃-GlcN-Ins-phospho-lipid is not sufficient for induction of TNF- α and IL-1 β expression, suggesting the requirement for another signaling in order for cytokines expression and macrophage activation to occur. The sn-1,2 diacylglycerol (DAG) of *P. falciparum* and *T. brucei* GPIs activate the Ca²⁺ independent ϵ isoform of mammalian protein kinase C (PKC) (147). Activation of both PTK and PKC by *P. falciparum* and *T. brucei* GPIs in synergy with IFN- γ leads to induction of iNOS and TNF- α (146, 147, 153).

GPIs from LPG and GIPL of *L. major* regulate IFN- γ inducible iNOS expression in macrophages (154) via Ca²⁺ chelation and inhibition of PKC activation (152, 155). However, translocation of PKC to plasma membrane in response to Ca²⁺ occurs normally in presence of LPG (149, 156). LPG, therefore might inhibit events downstream of PKC recruitment (157).

Parasite derived GPIs thus play a role in regulating the host defense mechanisms. In some instances, activation appears to be an outcome of the interaction of parasite GPIs with host cells. The physiological advantage of such activation of immune functions to the parasite is elusive at the moment, although it is reasonable to explain the phenomenon as a legitimate host defense response. Suppression of host defense mechanism as documented for *Leishmania* seems more advantageous to the parasite. Evidently, numerous differences in the structure of GPIs are responsible for the variable outcomes. Identification of host receptors for the parasite GPIs will be a major challenge for the future.

E. Release of GPIs from Protozoan Parasites

Action of parasite-derived GPIs on host cells would require release of the glycolipids from the parasite plasma membrane. In *T. brucei* blood-stream form trypomastigotes, an endogenous GPI-PLC is expressed. The localization of GPI-PLC protein on the cytoplasmic side of intracellular membranes (158) suggests that GPI-PLC is unlikely to participate in release of GPIs which modulate the host cell activity. GPI intermediates synthesized on the cytosolic side of the endoplasmic reticulum (ER) membrane could be accessible to the enzyme *in vivo*. It can be hypothesized that GPI precursors are either protected from degradation by control of GPI-PLC activity or excessive production of GPIs, so that even if co-localized, sufficient GPI precursors would escape from GPI-PLC to serve as anchors for VSG. GPI anchored proteins are also released during differentiation of some protozoan parasites. Shedding of VSG during differentiation of blood-stream form trypomastigotes to procyclics *in vitro* occurs via a proteolytic cleavage (159).

ことで、効果を発揮すると言われている。*P. falciparum*, *T. brucei*, *L. major*から精製したGPIは、ねずみのマクロファージ、人の血管内皮細胞での早いPTK活性化を誘導する(86、147、152)。PTK活性化に必要な最小限の構造は、Man₃-GlcN-Ins-phospho-lipidである(86、152)。しかし、このMan₃-GlcN-Ins-phospho-lipidによるPTK活性は、TNF- α 、IL- β の発現の誘導には十分ではない。サイトカイン発現とマクロファージ活性化を起こすために、別のシグナルが必要であることを示唆する。*P. falciparum*, *T. brucei*のGPIのsn-1,2ジアシルグリセロール(DAG)は、哺乳類のCa²⁺非依存性プロテインキナーゼC(PKC) ϵ 型を活性化する。INF γ との協同作用において、*P. falciparum*, *T. brucei* GPIによるPTKとPKCの活性化は、iNOSとTNF- α (146、147、153)の誘導へとつながる。

*L. major*のLPGとGIPLからのGPIは、Ca²⁺キレート化とPKC活性の阻害(152、155)を経てマクロファージ(154)でのINF γ 誘導型iNOS発現を調節する。Ca²⁺に反応してPKCが原形質膜に移るのは、LPGの存在下で普通に起こる(149、156)。LPGはそれゆえ、PKCの回復過程の後に起こる現象を阻害すると考えられる(157)。

このように寄生虫に由来するGPIは、宿主防御メカニズムを調節する役割を果たす。いくつかの例で、活性化は宿主細胞と寄生虫GPIの相互作用の結果である。寄生虫にとって、そのような免疫機能の活性化の生理的な利点は、ちょっとわかりにくい。けれども宿主防御反応として現象を説明するのに、道理に合っている。*Leishmania*で証明されるように宿主防御メカニズムの調節は、寄生虫にとって、より都合がよいようだ。

明らかにGPI構造での大きな違いは、様々な結果の原因となる。寄生虫GPIに対する宿主レセプターの同定は、将来の大きな目標となろう。

E. 原生動物の寄生虫からのGPI遊離

宿主細胞での寄生虫誘導GPIの作用は、寄生虫原形質膜から糖脂質の遊離を必要とする。*T. brucei* 血流型 trypomastigoteでは、内在性のGPI-PLCが発現している。細胞内膜の細胞質側にGPI-PLCタンパク質が局在化していることは(158)、宿主細胞活性を調節するGPIを放出するのに、GPI-PLCは関与しそうもないことを示唆している。*in vivo*では、小胞体(ER)膜の細胞質側で合成されたGPI中間体は、酵素の作用をうける可能性がある。GPI前駆体は、GPI-PLC活性のコントロールにより、またGPIの過度の産生により、分解から保護されると仮定されている。そしてたとえ共存しても、GPI-PLCの処理のあとでもVSGとしてのアンカーとして働くために、十分な量のGPI前駆体が残るだろうと考えられる。GPIアンカータンパク質は、また、いくつかの原生動物寄生虫の分化の際に遊離される。*in vitro*での血流型 trypomastigoteのprocyclicsへの分化の際にVSGの分解は、タンパ

Whether a protease releases VSG during antigenic variation is unknown.

In *T. cruzi*, a role for phospholipase C in the release of GPI anchored proteins was proposed due to the detection of cross-reacting determinant (CRD) epitope on Ssp-4 released from amastigotes (160). GPI anchored proteins display CRD epitope after cleavage by a GPI-PLC (161). We have not detected any potent, membrane-associated GPI-PLC activity that could facilitate the release of GPI anchored proteins in *T. cruzi* (Garg *et al.*, in preparation). The general mechanism by which GPI anchored proteins are released from *T. cruzi* was studied by an examination of the biochemical properties of a soluble, 180 kDa protein (2C2-BP) which bears an epitope detected by monoclonal antibody 2C2 on amastigote Ssp-4. Results from these studies on the mechanism of release of 2C2-BP do not favor a PLC-mediated process (Garg *et al.*, in preparation). Also, in *T. cruzi* trypomastigotes, Tc-85 is shed with an intact GPI (27, 162). From these reports, it appears that release of GPI anchored proteins in *T. cruzi* may occur by different mechanisms. The GPI-PLC endogenous to *T. brucei* has not been detected in *Leishmania* or *T. cruzi*. The current evidence favors protease-mediated release. The existence of proteases on the plasma membrane of *T. cruzi* (gp50/55, members of cruzipain family) (163–166) and *Leishmania* (gp63) (167) lends credence to this possibility. The fate of the peptidyl-GPIs that might be generated after proteolytic cleavage of the GPI-anchored proteins remain unclear.

F. Conclusion

Studies on GPIs have progressed rapidly since the structure of protein-GPI was solved a decade ago. In particular, several distinct features have emerged concerning the GPI biosynthetic pathway in protozoans and animal cells. Parasitic protozoans utilize GPIs as a major mode of surface protein anchorage, and are far more dependent on GPIs for their growth and survival than mammalian cells. Molecular cloning and understanding the function of the genes involved in GPI biosynthesis in protozoans might provide important insights on the molecular mechanisms which govern the growth and differentiation of protozoan parasites. Disruption of GPI biosynthesis by targeted deletion of genes may result in the development of avirulent mutants whose utility in vaccine development can then be explored. Characterization of the biochemical properties and structural analysis of GPI biosynthesis gene products will determine the specificity of the enzymes involved in GPI biosynthesis in protozoans and mammalian cells. If significantly different, molecules which inhibit the GPI biosynthesis in parasitic protozoans and prove detrimental to the parasites without affecting the host, would have utility in chemotherapeutic treatment of several parasitic protozoan infections. The importance of parasite GPIs as signal transducers, and the molecular mechanism of activation or suppression of host immune reactions by GPIs

ク質分解(159)経由で起こる。抗原が変化する間、VSGをプロテアーゼが遊離するかどうかはわかっていない。

*T. cruzi*では、amastigote (160)から遊離するSsp-4上のcross-reacting determination (CRD)のエピトープが確認された結果、GPIアンカータンパク質の遊離においてホスホリパーゼCが関与すると考えられた(160)。GPI-PLCによって分解した後、GPIアンカータンパク質は、CRDエピトープを露出する(161)。しかし、*T. cruzi*のGPIアンカータンパク質の遊離を促進できるいかなる膜に結合したGPI-PLC活性をも、我々はみつけることができなかった。*T. cruzi*からGPIアンカータンパク質が遊離される一般的メカニズムは、可溶性180kDa binding protein (2C2-BP)の生化学性質を調べることによって研究されてきた。この2C2-BPは、amastigote Ssp-4のモノクローナル抗体2C2によって検出できるエピトープを持っている。2C2-BP遊離メカニズムのこれらの研究の結果は、PLCの媒介過程(Gargら)とは合致しない。また、*T. cruzi* trypomastigote、Tc-85は、完全なGPIで遊離される(27、162)。これらの研究から、*T. cruzi*でのGPIアンカータンパク質の遊離は異なったメカニズムで起こるかもしれない。*T. brucei*に内在的なGPI-PLCは、*Leishmania*や*T. cruzi*では見つからなかった。現在の証拠は、プロテアーゼによる遊離という考えに合致している。*T. cruzi* (gp50/55, cruzipain 族のメンバー)と*Leishmania* (gp63) (167)の原形質膜上でのプロテアーゼの存在は、この可能性をより確かなものとしている。GPIアンカータンパク質のタンパク質分解の後、発生するかもしれないペプチジルGPIがどうなるかは、わからないままである。

F. 結論

GPIに関する研究は、10年前タンパクGPIの構造が解明されて以来急速に進歩した。特に、いくつかの異なった特徴が、原生動物と動物細胞におけるGPI生合成経路に関連して出現した。

寄生性原生動物は、主要な表面タンパク質アンカーとしてGPIを利用する。そして、その成長と生存を、哺乳類細胞以上にGPIに依存している。原生動物でのGPI生合成に関与する分子クローニングと遺伝子機能の理解は、原生動物寄生虫の成長と分化を制御する分子メカニズムに対して、重要な示唆を与えるかもしれない。ターゲット遺伝子を削除することで、GPI生合成を止めることにより、virulentでない変異株の開発につながる。そして、それを用いてのワクチン開発の可能性が開ける。GPI生合成の遺伝子産物の生化学的性質の解明と構造解析により、原生動物と哺乳類細胞でのGPI生合成に関与する酵素の特異性を決めることができる。もしかなり異なるなら、寄生虫原生動物においてGPI生合成を阻害する分子や、宿主に影響を与えることがなくかつ寄生虫に有効なpropeは、いくつかの寄生虫原生動物感染の化学療法治療において有用になろう。シグナル伝達としての寄生虫 GPIの重要性和GPIによる宿主免疫反応活性化、あるいは抑制の分子メカニズムについてはさらに調べる必要がある。

needs to be explored. The GPIs may prove useful as synthetic agonists or antagonists to study the course of the acute and chronic phase of diseases caused by protozoan parasites. Finally, GPI anchored proteins which are shed during intracellular development of the infective protozoans have been suggested to be the prime source of peptides for recognition by parasite specific cytotoxic T cells (168). Three *T. cruzi* GPI anchored proteins which are expressed in infective and intracellular stages have been identified as potential targets for CD8⁺ CTLs from chronically infected mice or humans (169, 170). Since anti-parasite CTL activity is the major effector mechanism in control of intracellular parasites, cloning and identification of genes encoding GPI anchored proteins of protozoan parasites which enter the MHC class I pathway of antigen processing and presentation, and serve as good CTL target molecules, is required to explore their possible utilization in the development of multi-component protein or genetic vaccines against parasitic infections.

Acknowledgements

I am grateful to Drs. Rick L. Tarleton and Kojo Mensa-Wilmot who introduced me to protozoan parasites biology. My thanks are also due to RLT for his immense support and helpful discussions and KM-W for his critical comments on the manuscript. NG was supported by a WHO/TDR grant 940352 and a Biotechnology grant from the University of Georgia Research Foundation.

References

1. Ferguson, M.A.J. (1994) *Parasitology Today* **10**, 48–52
2. Ferguson, M.A.J. (1995) *Methods in Enzymology* **250**, 614–630
3. Ferguson, M.A.J. (1997) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **352**, 1295–1302
4. McConville, M.J., and Ferguson, M.A.J. (1993) *Biochem. J.* **294**, 305–324
5. Englund, P.T. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 121–138
6. Schofield, L., and Tachado, S.D. (1996) *Immunol. Cell Biol.* **74**, 555–563
7. Stevens, V.L. (1995) *Biochem. J.* **310** (Pt 2), 361–370
8. Udenfriend, S., and Kodukula, K. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 563–591
9. Ferguson, M.A.J., Halder, K., and Cross, G.A.M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 4963–4968
10. Ferguson, M.A., Homans, S.W., Dwek, R. A., and Rademacher, T. W. (1988) *Biochem. Soc. Trans.* **16** (3), 265–268
11. Murray, P.J., Spithill, T.W., and Handman, E. (1989) *J. Immunol.* **143** (12), 4221–4226
12. McConville, M.J., Thomas Oates, J.E., Ferguson, M.A., and Homans, S.W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 19611–19623
13. Schneider, P., Ferguson, M.A., McConville, M.J., Mehlert, A., Homans, S.W., and Bordier, C. (1990) *J. Biol. Chem.* **265** (28), 16955–16964
14. Heise, N., Cardoso de Almeida, M.L., and Ferguson, M.A.J. (1995) *Mol. Biochem. Parasitol.* **70**, 71–84
15. Serrano, A.A., Schenkman, S., Yoshida, N., Mehlert, A., Richardson, J.M., and Ferguson, M.A.J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** (45), 27244–27253
16. Heise, N., Raper, J., Buxbaum, L.U., Peranovich, T. M. S., and Cardoso de Almeida, M. L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 16877–16887
17. Gerold, P., Dieckmann-Schuppert, A., and Schwarz, R.T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** (4), 2597–2606
18. Gerold, P., Schofield, L., Blackman, M., Holder, A., and Schwarz, R. (1996) *Mol. Biochem. Parasitol.* **75**, 131–143
19. Tomavo, S., Dubremetz, J.F., and Schwarz, R.T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** (30), 21446–21458
20. Tomavo, S., Dubremetz, J.F., and Schwarz, R.T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** (17), 11721–11728
21. Fankhauser, C., Homans, S.W., Thomas Oates, J.E., McConville, M.J., Desponds, C., Conzelmann, A., and Ferguson, M.A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268** (35), 26365–26374
22. Sipos, G., Puoti, A., and Conzelmann, A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** (34), 19709–19715
23. Field, M.C., Medina Acosta, E., and Cross, G.A. (1991) *Mol. Biochem. Parasitol.* **48** (2), 227–229
24. Guthrie, M.L., Cardoso de Almeida, M.L., Yoshida, N., and Ferguson, M.A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** (10), 6820–6828
25. Previato, J.O., Jones, C., Xavier, M.T., Wait, R., Travassos, L.R., Parodi, A.J., and Mendonca-Previato, L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** (13), 7241–7250

原生動物寄生虫が原因である急性、慢性の疾患を研究するのに GPIは、合成アゴニストあるいはアンタゴニストとして役立つことが明らかになるだろう。感染性原生動物の細胞内の分化中に脱ぎ捨てられるGPIアンカータンパク質は、寄生虫特異的細胞傷害性T cell (168)による認識にとって、ペプチドの最も重要な sourceであると考えられている。感染性及び細胞内stageで発現する3つの*T. cruzi* GPIアンカータンパク質は、慢性的に感染したねずみと人(169、170)から、CD8⁺ CTLにとって可能性のあるターゲットとして同定された(169、170)。原生動物に対するCTL活性は、細胞内寄生虫のコントロールにおいて主要なエフェクターメカニズムなので、抗原のプロセッシングや提示のMHCクラスI経路に入る感染性原生動物のGPIアンカータンパク質をコードしている遺伝子の同定で、クローニングが、寄生虫感染に対して、多成分タンパク、遺伝子ワクチンの開発における利用の可能性を高める為に必要である。

名古屋市立大学・薬学部・微生物薬品化学教室
早川 潤 記

26. Ferguson, M.A. (1992) *Biochem. J.* **284** (Pt 2), 297–300
27. Abuin, G., Couto, A.S., de Lederkremer, R.M., Casal, O.L., Galli, C., Colli, W., and Alves, M.J. (1996) *Exp. Parasitol.* **82** (3), 290–297
28. Tomavo, S., Dubremetz, J.F., and Schwarz, R.T. (1993) *Biol. Cell.* **78** (3), 155–162
29. Field, M.C., Menon, A.K., and Cross, G.A. (1991) *EMBO J.* **10** (10), 2731–2739
30. Bertello, L.A., Andrews, N.W., and de Lederkremer, R.M. (1997) *Mol. Biochem. Parasitol.* **79**, 143–151
31. Turco, S.J., Hull, S., Orlandi, P.A., and Shepherd, S.D. (1987) *Biochem.* **26**, 6233–6238
32. McConville, M.J., Bacic, A., Mitchell, G.F., and Handman, E. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84** (24), 8941–8945
33. Turco, S.J., Orlandi, P.A., Homans, S.W., Ferguson, M.A., Dwek, R.A., and Rademacher, T.W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264** (12), 6711–6715
34. Rosen, G., Pahlsson, P., Londener, M.V., Westerman, M.E., and Nilsson, B. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 10457–10463
35. McConville, M.J., Homans, S.W., Thomas Oates, J.E., Dell, A., and Bacic, A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7385–7394
36. McConville, M.J., and Bacic, A. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**, 57–67
37. McConville, M.J., and Blackwell, J.M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266** (23), 15170–15179
38. de Lederkremer, R.M., Lima, C., Ramirez, M.I., Ferguson, M.A., Homans, S.W., and Thomas Oates, J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266** (35), 23670–23675
39. Golgher, D.B., Colli, W., Souto-Pradon, T., and Zingales, B. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**, 249–264
40. Previato, J.O., Jones, C., Goncalves, L.P., Wait, R., Travassos, L., and Mendonca-Previato, L. (1994) *Biochem. J.* **301**, 151–159
41. Smith, T.K., Milne, F.C., Sharma, D.K., Crossman, A., Brimacombe, J.S., and Ferguson, M.A.J. (1997) *Biochem. J.* **326**, 393–400
42. Stevens, V.L., and Raetz, C.R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266** (16), 10039–10042
43. Hirose, S., Ravi, L., Hazra, S.V., and Medof, M.E. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (9), 3762–3766
44. Stevens, V.L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268** (13), 9718–9724
45. Costello, L.C., and Orlean, P. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** (12), 8599–8603
46. Doering, T.L., Masterson, W.J., Englund, P.T., and Hart, G.W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264** (19), 11168–11173
47. Menon, A.K., Eppinger, M., Mayor, S., and Schwarz, R.T. (1993) *EMBO J.* **12**, 1907–1914
48. Menon, A.K., and Vidugiriene, J. (1994) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27** (2), 167–175
49. Udenfriend, S., and Kodukula, K. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 563–591
50. Benghezal, M., Benachour, A., Rusconi, S., Aebi, M., and Conzelmann, A. (1996) *EMBO J.* **15** (23), 6575–6583
51. Yu, J., Nagarajan, S., Knez, J.J., Udenfriend, S., Chen, R., and ME, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12580–12585
52. Mensa-Wilmot, K., LeBowitz, J.H., Chang, K.P., Al Qahtani, A., McGwire, B.S., Tucker, S., and Morris, J.C. (1994) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27** (2), 177–184
53. Mensa-Wilmot, K., LeBowitz, J.H., Chang, K.P., Al Qahtani, A., McGwire, B.S., Tucker, S., and Morris, J.C. (1994) *J. Cell. Biol.* **124** (6), 935–947
54. Ryan, K.A., Garraway, L.A., Descoteaux, A., Turco, S.J., and Beverley, S. M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8609–8613
55. Inoue, N., Kinoshita, T., Orii, T., and Takeda, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268** (10), 6882–6885
56. Kamitani, T., Chang, H.M., Rollins, C., Waneck, G.L., and Yeh, E. T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268** (28), 20733–20736
57. Miyata, T., Takeda, J., Iida, Y., Yamada, N., Inoue, N., Takahashi, M., Maeda, K., Kitani, T., and Kinoshita, T. (1993) *Science* **259** (5099), 1318–1320
58. Hamburger, D., Egerton, M., and Riezman, H. (1995) *J. Cell. Biol.* **129** (3), 629–639
59. Leidich, S. D., Kostova, Z., Latek, R.R., Costello, L.C., Drapp, D.A., Gray, W., Fassler, J.S., and Orlean, P. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** (22), 13029–13035
60. Schonbachler, M., Horvath, A., Fassler, J., and Riezman, H. (1995) *EMBO J.* **14** (8), 1637–1645
61. Benghezal, M., Benachour, A., Rusconi, S., Aebi, M., and Conzelmann, A. (1996) *EMBO J.* **15**, 6575–6583
62. Inoue, N., Watanabe, R., Takeda, J., and Kinoshita, T. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226** (1), 193–199
63. Takahashi, M., Inoue, N., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N., Endo, Y., Fujita, T., Takeda, J., and Kinoshita, T. (1996) *EMBO J.* **15**, 4254–4261
64. Mohny, R.P., Knez, J.J., Ravi, L., Sevlever, D., Rosenberry, T.L., Hirose, S., and Medof, M.E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** (9), 6536–6542
65. Chen, R., Udenfriend, S., Prince, G.M., Maxwell, S.E., Ramalingam, S., Gerber, L.D., Knez, J., and Medof, M.E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (6), 2280–2284
66. Vossen, J.H., Ram, A.F., and Klis, F.M. (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* **1243** (3), 549–551
67. Nakamura, N., Inoue, N., Watanabe, R., Takahashi, M., Takeda, J., Stevens, V.L. *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15834–15840
68. Masterson, W.J., Raper, J., Doering, T.L., Hart, G.W., and Englund, P.T. (1990) *Cell* **62**(1), 73–80
69. de Lederkremer, R.M., Lima, C.E., Ramirez, M.I., Goncalvez, M.F., and Colli, W. (1993) *Eur. J. Biochem.* **218** (3), 929–936
70. Ralton, J.E., and McConville, M.J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 4245–4257
71. Conzelmann, A., Puoti, A., Lester, R.L., and Desponds, C. (1992) *EMBO J.* **11** (2), 457–466
72. Sipos, G., Puoti, A., and Conzelmann, A. (1994) *EMBO J.* **13**, 2789–2796
73. Sipos, G., Reggiori, F., Vionnet, C., and Conzelmann, A. (1997) *EMBO J.* **16** (12), 3494–3505
74. Buxbaum, L.U., Raper, J., Oppendoes, F.R., and Englund, P.T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** (48), 30212–30220
75. Buxbaum, L.U., Milne, K.G., Werbovetz, K.A., and Englund, P.T. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (3), 1178–1183
76. Urakaze, M., Kamitani, T., DeGasperi, R., Sugiyama, E., Chang, H.M., Warren, C.D., and Yeh, E.T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** (10), 6459–6462
77. Doerrler, W.T., Ye, J., Faick, J.R., and Lehrman, M.A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 27031–27038
78. Guthrie, M.L., and Ferguson, M.A. (1995) *EMBO J.* **14** (13), 3080–3093
79. Guthrie, M.L., Masterson, W.J., and Ferguson, M.A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** (28), 18694–18701
80. Guthrie, M.L., Masterson, W.J., and Ferguson, M.A. (1994) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27** (2), 121–126
81. Guthrie, M.L., Treumann, A., and MA, F. (1996) *Mol Biochem Parasitol* **77**, 137–145
82. Tomavo, S., Martinage, A., and Dubremetz, J.F. (1992) *Parasitol. Res.* **78** (7), 541–544
83. Hirose, S., Mohny, R.P., Mutka, S.C., Ravi, L., Singleton, D.R., Perry, G., Tartakoff, A.M., and Medof, M.E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** (8), 5272–5278

84. Sutterlin, C., Horvath, A., Gerold, P., Schwarz, R.T., Wang, Y., Dreyfuss, M., and Reizman, H. (1997) *EMBO J.* **16**, 6374–6383
85. Smith, T.K., Sharma, D.K., Crossman, A., Dix, A., Brimacombe, J. S., and Ferguson, M.A.J. (1997) *EMBO J.* **16**, 6667–6675
86. Schofield, L., and Tachado, S. D. (1996) *Immunol. Cell Biol.* **74**, 555–563
87. Liu, X., and Chang, K. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4991–4995
88. McGwire, B., and Chang, K.P. (1994) *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**, 345–347
89. Kink, J.A., and Chang, K.P. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* **27**, 181–190
90. Joshi, P., Sacks, D., Modi, G., and McMaster, W. (1998) *Mol Microbiol* **27** (3), 519–530
91. Russell, D.G., Ip, H.S., and Medina -Acosta, E. (1991) in *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism* (Wang, C.C., ed.), pp. 73–85, Washington, D.C., American Association for the Advancement of Science
92. Russell, D.G. (1994) *Protoplasma* **181**, 191–201
93. Rizvi, F.S., Ouasssi, M.A., Marty, B., Santoro, F., and *et al.* (1988) *Eur. J. Immunol.* **18** (3), 473–476
94. Russell, D. (1987) *Eur. J. Biochem.* **164**, 213–221
95. Chaudhuri, G., and Chang, K.P. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* **27**, 43–52
96. Chaudhuri, G., Chaudhuri, M., Pan, A., and Chang, K.P. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 7483–7489
97. Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R., McGwire, B.S., Chang, K.P., and Mosser, D. (1995) *J. Immunol.* **155**, 3102–3111
98. Pimenta, P.F.P., Saraiva, E.M.B., Rowton, E., Modi, G.B., Garraway, L.A., Beverley, S.M., Turco, S.J., and Sacks, D.L. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9155–9159
99. Butcher, B.A., Turco, S.J., Hilty, B.A., Pimenta, P.F., Panunzio, M. *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* **271** (34), 20573–20579
100. McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A.J., and Sacks, D.L. (1992) *EMBO J.* **11**, 3593–3600
101. Kelleher, M., Bacic, A., and Handman, E. (1992) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**, 6–10
102. Sacks, D.L., Pimenta, P.F.P., McConville, M. J., Schneider, P., and Turco, S.J. (1995) *J. Exp. Med.* **181**, 685–697
103. Camara, M., Ortiz, G., Valero, P.L., Molina, R., Navarro, I., Chance, M.L. *et al.* (1995) *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **89**, 243–251
104. McNeely, T., and Turco, S. (1990) *J. Immunol.* **144**, 2745–2750
105. Cappai, R., Morris, L., Aebischer, T., Bacic, A., Curtis, J.M., Kelleher, M., McLeod, K.S., Moody, S.F., Osborn, A.H., and Handman, E. (1994) *Parasitology* **108**, 397–405
106. Handman, E., Schnur, L.F., Spithill, T.W. *et al.* (1986) *J Immunol* **137**, 3608–3613
107. Shankar, A., Mitchen, T.K., Hall, L.R., Turco, S.J., and Titus, R.G. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**, 207–216
108. Opat, A., Ng, K., Currie, G., Handman, E., and Bacic, A. (1996) *Glycobiology* **6**, 387–397
109. Gonzalez, J., Araguth, M.F., and Yoshida, N. (1991) *Infect. Immun.* **59** (3), 863–867
110. Santori, F. R., Paranhos-Bacalla, G.S., Franco, D.A.S.J., Yamauchi, L.M., Araya, J.E., and Yoshida, N. (1996) *Infect. Immun.* **64** (4), 1093–1099
111. Ruiz, R., Rigoni, V.L., Gonzalez, J., and Yoshida, N. (1993) *Parasitol. Immunol.* **15**, 121–125
112. Dorta, M.L., Ferreira, A.T., Oshiro, M.E., and Yoshida, N. (1995) *Mol. Biochem. Parasitol.* **73** (1–2), 285–289
113. Andrews, N.W., Hong, K.-S., Robbins, E.S., and Nussenzweig, V. (1987) *Exp. Parasitol.* **64**, 474–484
114. Abuin, G., Colli, W., de Souza, W., *et al.* (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* **35**, 229–237
115. Burleigh, B.A., and Andrews, N. W. (1995) *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 175–200
116. Yoshida, N., Blanco, S.A., Araguth, M.F., Russo, M., and Gonzalez, J. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**(1), 39–46
117. Yoshida, N., Mortara, R.A., Araguth, M.F., Gonzalez, J.C. *et al.* (1989) *Infect. Immun.* **57**, 1663–1667
118. Schenkman, S., Jiang, M.S., Hart, G.W., and Nussenzweig, V. (1991) *Cell* **65** (7), 1117–1125
119. Schenkman, S., Diaz, C., and Nussenzweig, V. (1991) *Exp. Parasitol.* **72** (1), 76–86
120. Alves, M.J.M., Abuin, G., Kuwajima, V.Y., and Colli, W. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* **21**, 75–82
121. Schenkman, S., Ferguson, M.A.J., Heise, N., deAlmeida, M.L.C., Mortara, R.A., and Yoshida, N. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 293–304
122. Schenkman, S., Kurosaki, T., Ravetch, V., and Nussenzweig, V. (1992) *J. Exp. Med.* **175** (175), 1635–1641
123. de Titto, E.H. and Araujo, F.G. *Acta Trop.* **44**, 273–282
124. Henriquez, D., Piras, R., and Piras, M.M. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* **2**, 359–366
125. Schenkman, R.P., Vandekerckhove, F., and Schenkman, S. (1993) *Infect. Immun.* **61** (3), 898–902
126. Ciavaglia, M. do C., de Carvalho, T.U., de Souza, W. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193** (2), 718–721
127. Garg, N., Postan, M., Mensa-Wilmot, K., and Tarleton, R.L. (1997) *Infect. Immun.* **65**, 4055–4060
128. Andrews, N.W. (1995) *Trends Cell Biol* **5** (3), 133–137
129. Docampo, R., Scott, D.A., Vercesi, A.E., Moreno, S.N., Santori, F.R., Paranhos Bacalla, G.S., Franco, D.A.S.J., Yamauchi, L.M., Araya, J.E., and Yoshida, N. (1995) *Biochem. J.* **310**, 1005–12
130. Rodriguez, A., Samoff, E., Rioult, M.G., Chung, A., and Andrews, N.W. (1996) *J. Cell Biol.* **134**, 349–362
131. de Diego, J., Punzon, C., Duarte, M., and Fresno, M. (1997) *J. Immunol.* **159**, 4983–89
132. Hall, B.F., Webster, P., Ma, A.K., Joiner, K.A., and Andrews, N.W. (1992) *J. Exp. Med.* **176** (2), 313–325
133. Hall, B.F. (1993) *Semin. Cell Biol.* **4** (5), 323–333
134. Homans, S.W., Edge, C.J., Ferguson, M.A., Dwek, R.A., and Rademacher, T.W. (1989) *Biochemistry* **28** (7), 2881–2887
135. Ferguson, M.A.J. (1992) *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 243–256
136. McConville, M.J. (1995) *Aust. N.Z.J. Med.* **25**, 768–776
137. Barry, J.D. (1997) *Parasitol. Today* **13**, 212–218
138. Ferguson, M.A., Murray, P., Rutherford, H., and McConville, M.J. (1993) *Biochem. J.* **291**, 51–55
139. Engstler, M., Reuter, G., and Schauer, R. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* **61** (1), 1–13
140. Garg, N., Tarleton, R.L., and Mensa-Wilmot, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12482–12491
141. James, S.L., and Nacy, C. (1993) *Curr. Opin. Immunol.* **5** (4), 518–523
142. James, S. (1995) *Microbiol. Rev.* **59** (4), 533–547
143. Camargo, M.M., Almeida, I.C., Pereira, M.E.S., Ferguson, M.A.J., Travassos, L.R., and Gazzinelli, R.T. (1997) *J. Immunol.* **158**, 5890–

5901

144. Camargo, M.M., Andrade, A.C., Almeida, I.C., Travassos, L.R., and Gazzinelli, R.T. (1997) *J. Immunol.* **159**, 6131–6139
145. Schofield, L., and Hackett, F. (1993) *J. Exp. Med.* **177** (1), 145–153
146. Tachado, S.D., and Schofield, L. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205** (2), 984–991
147. Tachado, S.D., Gerold, P., McConville, M.J., Baldwin, T., Quilici, D., Schwarz, R.T., and Schofield, L. (1996) *J. Immunol.* **156** (5), 1897–1907
148. Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Feng, G.J., Wei, X.Q., Ferguson, M.A.J., Brimacombe, J.S., and Liew, F.Y. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10984–10989
149. Descoteaux, A., Turco, S.J., Sacks, D.L., and Matlashewski, G. (1991) *J. Immunol.* **146**, 2747–2753
150. Proudfoot, L., O'Donnell, C.A., and Liew, F.Y. (1995) *Eur. J. Immunol.* **25**, 745–750
151. Liew, F.Y., Wei, X.Q., and Proudfoot, L. (1997) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **352**, 1311–1315
152. Tachado, S.D., Gerold, P., Schwarz, R.T., Novakovic, S., McConville, M.J., and Schofield, L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4022–4027
153. Schofield, L., Vivas, L., Hackett, F., Gerold, P., Schwarz, R.T., and Tachado, S. (1993) *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **87** (6), 617–626
154. Proudfoot, L., O'Donnell, C.A., and Liew, F.Y. (1995) *J. Immunol.* **25**, 745–750
155. Descoteaux, A., Salvatore, Y.L., Turco, J., and Beverley, S.M. (1995) *Science* **269**, 1869–1871
156. Descoteaux, A., Matlashewski, G., and Turco, S.J. (1992) *J. Immunol.* **149**, 3008–3015
157. Giorgione, J.R., Turco, S.J., and Epand, R.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11634–11639
158. Bulow, R., Nonnengasser, C. and Overath, P. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* **32**, 85–92
159. Ziegelbauer, K., Stahl, B., Karas, M., Stierhof, Y.D., and Overath, P. (1993) *Biochem.* **32**, 3737–3742
160. Andrews, N.W., Robins, E.S., Ley, V., Hong, K.S., and Nussenzweig, V. (1988) *J. Exp. Med.* **167**, 300–314
161. Zamze, S.E., Ferguson, M.A.J., Collins, R., Dwek, R.A., and Rademacher, T.W. (1988) *Eur. J. Biochem.* **176**, 527–534
162. Goncalves, M.F., Umezawa, E.S., Katzin, A.M., de Souza, W., Alves, M.J., Zingales, B., and Colli, W. (1991) *Exp. Parasitol.* **72** (1), 43–53
163. Campetella, O., Henriksson, J., Aslund, L., Frasc, A.C., Pettersson, U., and Cazzulo, J.J. (1992) *Mol. Biochem. Parasitol.* **50** (2), 225–234
164. Malchiodi, E.L., Chiamonte, M.G., Martinez, J.A., Zwirner, N. W., Margni, R.A., and Cazzulo, J.J. (1993) *Immunol Lett* **35** (1), 59–62
165. Tomas, A.M., Miles, M.A., and Kelly, J.M. (1997) *Eur. J. Biochem.* **244**, 596–603
166. Fresno, M., Hernandez, M.C., de Diego, J., Rivas, L., Scharfstein, J., and Bonay, P. (1994) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27** (2), 431–437
167. Bouvier, J., Schneider, P., and Etges, R. (1995) *Methods Enzymol.* **248**, 614–633
168. Garg, N., Nunes, M.P., and Tarleton, R.L. (1997) *J. Immunol.* **158**, 3293–3302
169. Wizel, B., Nunes, M.P., and Tarleton, R.L. (1997) *J. Immunol.* **159**, 6120–6130
170. Low, H.P., Santos, M.A.M., Wizel, B., and Tarleton, R.L. (1998) *J. Immunol.* **160**, 1817–1823

Received on June 2, 1998, accepted on June 30, 1998

Profile of the Author

Nisha Garg

Graduated in Biochemistry/Molecular Biology from Haryana Agriculture University, India. The field of interest for graduation was the “Genetics of nitrogen fixation and nodulation in legume crops” which was later pursued with funding from Common-Wealth and Council of Scientific and Industrial Research (CSIR) at AFRC unit of N₂ fixation, University of Sussex, UK and Haryana Agriculture University, India, respectively. Since 1993, professional activity in the field of Biology of parasitic kinetoplastids is developed at the Department of Cellular Biology of the University of Georgia, USA. Specifically, as an Assistant Scientist, I am inter-

ested in understanding the biological significance of the glycosylphosphatidylinositols, the major mode of surface protein anchorage in parasitic protozoans; characterization of GPI-biosynthesis pathway and utilization of enzymes involved in GPI-biosynthesis as chemotherapeutic targets. Other interest involves the understanding of the course of Chagas' disease caused by parasitic protozoan *Trypanosoma cruzi*, the identification and characterization of the *T. cruzi* molecules that are targets of host immune responses and the utilization of genes encoding these target molecules as vaccine candidates for prevention and treatment of *T. cruzi* infection.