

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09568

研究課題名(和文) 宿主アポトーシスと病原体のクロストークの解明による感染制御の新秩序の探索

研究課題名(英文) Search for a novel anti-pathogen defense system by studying host-pathogen interactions

研究代表者

白井 睦訓 (SHIRAI, Mutsunori)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20196596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1)アポトーシスとクラミジア感染の関連についての解析ならびに2)アポトーシス制御に關与するYAPシグナルの観点から、メダカ個体と三次元オルガノイド培養系を用いた解析を遂行した。

1)アポトーシス制御における宿主の因子を解明する実験において、我々は、Hela細胞やMEFにおける肺炎クラミジア感染をApaf-1が促進する一方、Caspase-9の抑制がその感染を制限していることを見出した。

2)メダカおよびヒト培養細胞を用いた遺伝子発現解析から、YAPによる免疫系シグナル分子の発現制御は、魚類からヒトに至るまで進化的に保存されていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：1) In an attempt to elucidate host factor involvement in apoptosis regulation, we found that inhibition of Caspase-9 restricted, while Apaf-1 promoted, Chlamydia pneumoniae infection in Hela and MEF cells.

2) To clarify the YAP signaling involvement in the host-pathogen interaction by using small fish medaka as model system, we carried out RNA-seq analysis of YAP knockout medaka. We found that YAP regulates many of the key genes involved in host immune pathway.

研究分野：感染症内科学

キーワード：病原体 アポトーシス 免疫 YAPシグナル

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで細菌の全ゲノム解析をはじめとした生物情報学的解析を駆使し、感染制御における宿主-細菌間相互作用の分子機序を明らかにしてきた [Nucl. Acids Res. (2000); J. Antimicrobiol. Chem. (2003), (2005); DNA Res. (2003), (2006); J. Biol. Chem. (2004), (2006)]. この過程で肺炎クラミジアの封入体膜タンパク IncA2 が caspase-9 活性を増強することや、ミトコンドリアタンパクとの相互作用により宿主細胞アポトーシスを調節して菌の増殖を制御することを見出している。一方、同研究室に所属する連携研究者の浅岡は、細胞増殖・細胞死の両者を制御する Hippo シグナル伝達系に着目し、Hippo シグナル伝達系の標的分子 YAP のメダカ変異体 (*hirame*) の解析を行ってきた。*hirame* 変異体は初期形態形成期より胚の厚みが扁平であり、上皮組織の構築異常と維持不全という特徴的な表現型を示す(図)。Hippo シグナル伝達系は、隣接細胞間の接触情報に基づいて細胞増殖と細胞死の両者を制御することにより、器官の形状やサイズを決定するとともに、がんの抑制シグナルとしての側面を持つ新規シグナル経路として近年注目を浴びている。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究では、病原体(クラミジア、肺炎球菌、セレウス菌、サルモネラ菌など)の病原因子と宿主のアポトソーム分子との相互作用など、未だ解明されていない病原体-宿主の相互作用機構に関する

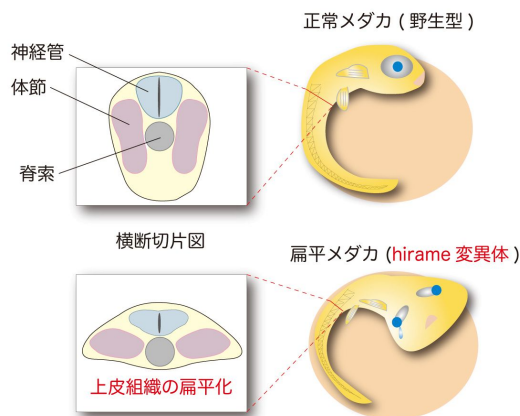


図: 上皮組織の3次元構築に異常を呈する *hirame* メダカ変異体

る基盤的な知見を得ることを主な目的とし

た。具体的には(1)アポトーシスとクラミジア感染の関連についての解析ならびに(2)アポトーシス制御に關与する YAP シグナルの観点から、メダカ個体と三次元オルガノイド培養系を用いた解析を行うことにした。

3. 研究の方法

(1)アポトーシスとクラミジア感染の関連についての解析は、主に HeLa 細胞や MEF 細胞などの培養細胞による感染実験系を用いた。(2) YAP シグナルの観点からの解析については、YAP のメダカ変異体である *hirame* 個体を用いたトランスクリプトーム解析を行った。具体的には、明確な表現型が確認できる 9 体節期のメダカ野生型胚 20 匹および *hirame* 変異体胚 20 匹から、それぞれ RNeasy Mini Kit を用いて total RNA の抽出を行った。3 回ずつ独立して抽出を行い合計 6 つの RNA サンプルを得た。これらの RNA サンプルを用いて RNA-seq 解析を行った。さらに三次元オルガノイド培養系を利用した感染実験も合わせて試みた。

4. 研究成果

(1)アポトーシスとクラミジア感染の関連についての解析

クラミジア感染は apaf-1 と caspase-9 から上位性の影響を受けることが判明した。すなわち、偏性寄生性病原細菌であるクラミジアは細胞膜に隣接する封入体の中でのみ分裂するが、クラミジアの細胞内分裂のための細胞膜トラフィッキングシステムの再構築や、持続感染を維持するため宿主細胞のアポトーシスを抑制するなど宿主細胞の多岐にわたり細胞プロセスを混乱させている。このアポトーシスの制御における宿主の因子を解明する実験において、我々は、HeLa 細胞や MEF における肺炎クラミジア感染を Apaf-1 が促進する一方、Caspase-9 の抑制がその感染を制限していることを解明した。クラミジアの感染に対するこれらの相対する働きは、さらに caspase-9 (-/-) と apaf-1 (-/-) MEF を用いて確認できた。同様の現象は、また性病クラミジアの感染の場合でも見られた。興味あることに、apaf-1 (-/-) MEF で caspase-9 は、クラミジアの感染で活性化したが、感染の間、caspase-3 は活性化されなかった。すなわち、Apaf-1 によるクラミジア

増幅や活性化の促進のない場合においても caspase-9 は活性化しており、その活性化した caspase-9 は caspase カスケードから物理的に切り離されたものであった。クラミジアの封入体の中での caspase-9 の蓄積が観察されたことは、この現象を部分的に説明するものである。クラミジアによるこの caspase-9 の caspase カスケードからの隔離は結果的にはアポトーシスの抑制に至るものと思われ、このアポトーシスの抑制はクラミジアの増殖サイクルには決定的なものである。Apaf-1 は、細胞内の自然免疫レセプターである NOD1 とドメイン構造を共有しており、そのことは、クラミジアの感染を制御する戦略の中で重要な役割を果たしているのかもしれない。

(2)アポトーシス関連 YAP シグナルの観点からの宿主-病原体の相互作用の解析

RNA-seq 法を用いてメダカ野生型胚と YAP 変異体 (*hirame*) 胚の間で比較トランスクリプトーム解析を試みた。その結果、免疫系のシグナル伝達分子など一連の遺伝子群の著明な発現変動が確認された。そこでヒト網膜色素上皮細胞 (RPE1 細胞) において q-PCR により遺伝子発現解析を行った結果、YAP のノックアウトに伴い免疫系のシグナル分子の発現が上昇する傾向が認められた。以上の結果から、YAP による免疫系シグナル分子の発現制御は魚類からヒトに至るまで進化的に広く保存されていると考えられた。今後、メダカにおける細菌感染系を樹立した上でトランスクリプトーム解析を実施することにより、アポトーシス関連 YAP シグナルが宿主-細菌間の相互作用に与える影響を明らかにできると考えられる。

次に大腸オルガノイドを用いた細菌感染系の構築を試みた。サルモネラ菌を直接オルガノイド培地に添加し感染を試みたが、宿主細胞内へのサルモネラ菌の侵入を確認することはできなかった。そこで、現在マイクロインジェクション法により、オルガノイド内腔へ直接サルモネラ菌を導入し感染効率の向上を目指している。今後、細菌感染オルガノイドを用いた RNA-seq 解析を行うことにより、YAP シグナルをはじめとしたアポトーシス関連シグナルと宿主-病原菌の相互作用に関する新たな知見が得られると期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15 件)

- (1) Nozomu Hanaoka, Minenosuke Matsutani, Masaaki Satoh, Motohiko Ogawa, Mutsunori Shirai, Shuji Ando. Development of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Detection of *Rickettsia* spp. *Jpn J Infect Dis.* 70:119-123 (2017), 査読有, DOI: 10.7883/yoken.JJID.2015.579.
- (2) Yoichi Asaoka, Makoto Furutani Seiki. YAP mediated mechano-homeostasis - conditioning 3D animal body shape. *Curr Opin Cell Biol.* 49:64-70 (2017), 査読有, DOI: 10.1016/j.ceb.2017.11.013.
- (3) 浅岡 洋一, 古谷-清木 誠, 再生医療-重力に抗した複雑な立体臓器の構築機構. 季刊 腎と骨代謝 30:227-232 (2017), 査読無, <https://webview.isho.jp/journal/detail/abs/10.19020/KB.0000000060>
- (4) Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina, Makoto Furutani Seiki. YAP is essential for 3D organogenesis withstanding gravity. *Dev Growth Differ.* 59:52-58 (2017), 査読有, DOI: 10.1111/dgd.12338.
- (5) Yoshimi Okamoto-Uchida, Ruoxing Yu, Norio Miyamura, Norie Arima, Mari Ishigami-Yuasa, Hiroyuki Kagechika, Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya, Makiko Nawa, Takeshi Kasama, Yoichi Asaoka, Reiner Wimmer Alois, Ulrich Elling, Josef M. Penninger, Sachiko Nishina, Noriyuki Azuma & Hiroshi Nishina. The mevalonate pathway regulates primitive streak formation via protein farnesylation. *Scientific Reports.* 6:37697 (2016), 査読有, DOI: 10.1038/srep37697.
- (6) Yoichi Asaoka, Yoko Nagai, Misako Namae, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina. SLC7 family transporters control the establishment of left-right asymmetry during organogenesis in medaka by activating mTOR signaling. *Biochem*

Biophys Res Commun.474:146-153 (2016), 査読有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.04.087.

(7) Yusuke Nasu, **Yoichi Asaoka**, Misako Nanae, Hiroshi Nishina, Hideaki Yoshimura and Takeaki Ozawa. Genetically Encoded Fluorescent Probe for Imaging Apoptosis in Vivo with Spontaneous GFP Complementation. Anal Chem. 88:844 (2016), 査読有, DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03367.

(8) Norimasa Tamehiro, Hiroyo Oda, **Mutsunori Shirai**, Harumi Suzuki. Overexpression of RhoH Permits to Bypass the Pre-TCR Checkpoint. PLoS One. 10:e0131047 (2015), 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0131047.

(9) Mohd. Akhlakur Rahman, **Mutsunori Shirai**, Md. Abdul Aziz, Rie Ushirokita, Sayuri Kubota, Harumi Suzuki, Yoshinao Azuma. An epistatic effect of apaf-1 and caspase-9 on chlamydial infection. Apoptosis. 20:1271-80 (2015), 査読有, DOI: 10.1007/s10495-015-1161-x.

(10) Minenosuke Matsutani, Kohei Ito, Yoshinao Azuma, Hidetaka Ogino, **Mutsunori Shirai**, Toshiharu Yakushi, Kazunobu Matsushita. Adaptive mutation related to cellulose producibility in Komagataeibacter medellinensis (Gluconacetobacter xylinus) NBRC 3288. Appl Microbiol Biotechnol. 99:7229-40 (2015), 査読有, DOI: 10.1007/s00253-015-6598-x.

(11) Sean Porazinski, Huijia Wang, **Yoichi Asaoka**, Martin Behrndt, Tatsuo Miyamoto, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S.F. Gabriel Krens, Yumi Osada, Satoshi Asaka, Akihiro Momoi, Sarah Linton, Joel B. Miesfeld, Brian A. Link, Takeshi Senga, Atahualpa Castillo-Morales, Araxi O. Urrutia, Nobuyoshi Shimizu, Hideaki Nagase, Shinya Matsuura, Stefan Bagby, Hisato Kondoh, Hiroshi Nishina, Carl-Philipp Heisenberg and Makoto Furutani-Seiki (Contributed equally). YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. Nature. 521:217-221 (2015), 査読有, DOI: 10.1038/nature14215.

(12) **浅岡 洋一**, 古谷 - 清木 誠, Carl-Philipp Heisenberg, 仁科 博史, 転写共役因子 YAP は脊椎動物の 3 次元的な形態を生み出す組織張力の制御に必要不可欠である. ライフサイエンス 新着論文レビュー (2015), 査読無, <http://first.lifesciencedb.jp/archives/9945>

(13) **浅岡 洋一**, 古谷 - 清木 誠, Carl-Philipp Heisenberg, 仁科 博史, 【GRAPHIC HOT PRESS】扁平メダカの解析から判明した脊椎動物の新しい 3D 器官形成機構. 細胞工学 34:796-797 (2015), 査読無, <https://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901696.html>

(14) **浅岡 洋一**, 古谷 - 清木 誠, Carl-Philipp Heisenberg, 仁科 博史, 扁平メダカの解析から判明した脊椎動物の新しい 3D 器官形成機構. 細胞工学別冊「最新バイオ論文解説総集編 1 今、この論文が熱い」 44-45 (2015), 査読無, <https://gakken-mesh.jp/book/detail/9784780909210.html>

(15) 古谷 - 清木 誠, **浅岡 洋一**, 仁科 博史, 細胞張力と 3D 臓器形成. 実験医学 33:2913-2919 (2015), 査読無, <https://www.yodosha.co.jp/yodobook/book/9784758101455/>

〔学会発表〕(計 14 件)

(1) **浅岡 洋一**, **白井 睦訓**, 微小重力下における宿主-病原体の相互作用解析モデルの構築. 第 87 回日本感染症学会西日本地方会 学術集会, 長崎ブリックホール, 長崎県長崎市, 2017 年 10 月 27 日

(2) Masayuki Tokunaga, **Yoichi Asaoka**, Carl-Philipp Heisenberg, Hiroshi Nishina, Makoto Furutani-Seiki et al., YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body/organ shape. The Hippo pathway across species and disciplines (EMBO workshop), Rome, Italy, 2017 年 10 月 26 日

(3) **浅岡 洋一**, 荻野 英賢, **白井 睦訓**, 宇宙環境における宿主-病原体の相互作用の解析に向けた感染モデルの構築. 第 70 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 広島大学, 広島県東広島市, 2017 年 10 月 14 日

(4) **浅岡 洋一**, **白井 睦訓**, 宇宙環境における宿主-病原体の相互作用変化の解析に向けたメダカ感染モデルの構築. 第 86 回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄県宜野湾市, 2016 年 11 月 24 日

(5) Makoto Furutani-Seiki, Hiroshi Nishina, Carl-Philipp Heisenberg, Sean Porazinski, Huijia Wang, **Yoichi Asaoka**, Martin Behrndt, Tatsuo Miyamoto, YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. Actin in Action: From Molecules to Cellular Functions (EMBL Symposium), Heidelberg, Germany, 2016 年 9 月 9 日

(6) **浅岡 洋一**, 仁科 博史, Carl-Philipp Heisenberg, 古谷-清木 誠, YAP は組織張力の制御を通して立体臓器を構築する. 日本遺伝学会第 88 回大会, 日本大学, 静岡県三島市, 2016 年 9 月 7 日

(7) **Yoichi Asaoka**, Yoko Nagai, Misako Namae, Makoto Furutani-Seiki, Hiroshi Nishina, SLC7 family transporters control the establishment of left-right asymmetry during organogenesis in medaka by activating mTOR signaling. 第 22 回小型魚類研究会, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知県岡崎市, 2016 年 8 月 20 日

(8) **Yoichi Asaoka**, Multiple Roles of Hippo-YAP Signaling Pathway in Organ Development: Lessons from Medaka and Zebrafish. International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知県岡崎市, 2016 年 3 月 18 日

(9) **Yoichi Asaoka**, Makoto Furutani-Seiki, Carl-Philipp Heisenberg and Hiroshi Nishina, YAP is essential for tissue tension to ensure proper formation of vertebrate 3D organs. CompBiol 2015 (第 40 回日本比較内分泌学会・第 37 回日本比較生理生化学会 合同大会), JMS アステールプラザ, 広島県広島市, 2015 年 12 月 11 日

(10) 古谷-清木 誠, Sean Porazinski, Huijia Wang, **浅岡 洋一**, Martin Behrndt, 宮本 達雄, 森田 仁, 畠 星治, 佐々木 貴史, S. F. Gabriel Krens, 長田 優美, 浅香

聡, 桃井 章裕, Sarah Linton, Joel Miesfeld, Brian Link, 千賀 威, Atahualpa Castillo-Morales, Araxi Urrutia, 清水 信義, 長瀬 秀明, 松浦 伸也, Bagby Stefan, 近藤 寿人, 仁科 博史, Carl-Philipp Heisenberg, YAP is essential for tissue tension regulating vertebrate 3D body shape. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸市, 2015 年 12 月 3 日

(11) **浅岡 洋一**, **白井 睦訓**, 宿主・病原体相互作用の解明に向けたメダカモデルの構築, 第 68 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 岡山大学, 岡山県岡山市, 2015 年 10 月 3 日

(12) **Yoichi Asaoka**, Makoto Furutani-Seiki, Carl-Philipp Heisenberg, Hiroshi Nishina, YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. 第 21 回小型魚類研究会, 大阪大学, 大阪府吹田市, 2015 年 9 月 20 日

(13) **浅岡 洋一**, 脊椎動物の初期胚発生期における Hippo-Yap シグナル伝達系の解析, むさしのバイオ研究会 Fish&Fly 2015, 杏林大学, 東京都三鷹市, 2015 年 8 月 29 日

(14) **浅岡 洋一**, 古谷-清木 誠, 仁科 博史, 初期胚発生期における Hippo-YAP シグナル伝達系の機能解析, 第 14 回生命科学研究会, 三浦市民ホール, 神奈川県三浦市, 2015 年 6 月 26 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

http://www.med.yamaguchi-u.ac.jp/medicine/chair/basic_09.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 睦訓 (SHIRAI, Mutsunori)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 2 0 1 9 6 5 9 6

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
浅岡 洋一 (ASAOKA, Yoichi)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 1 0 4 3 6 6 4 4

(4)研究協力者
なし