

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590481

研究課題名（和文）偏性細胞内寄生細菌・リケッチアの飢餓応答機構の解明

研究課題名（英文）A study on the starvation response mechanism of *Rickettsia*, an obligate intracellular parasitic bacteria

研究代表者

内山 恒夫 (UCHIYAMA TSUNEO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授 研究者番号：90151901

研究成果の概要（和文）：リケッチアの媒介節足動物・マダニの飢餓環境におけるリケッチア生残のための応答機構の解明を目標とし、マダニ細胞での飢餓状態成立をモニターするためのオートファジー関連抗原 Atg12 抗体を作製した。また、マダニ細胞、ほ乳動物細胞に非病原性紅斑熱群リケッチアを感染させると、リケッチア増殖の抑制がみられ、オートファジーの関与が示唆された。これに病原性株を重感染すると非病原性リケッチアの増殖が惹起され、病原性株がオートファジー抑制因子を産生している可能性が推測された。

研究成果の概要（英文）：We generated antibody to autophagy-related antigen Atg12 of a tick to monitor the establishment of starvation state on tick cells to elucidate the response mechanism for rickettsiae to survive in an environment of starvation in ticks, arthropod vectors of rickettsiae. When tick cells and mammalian cells were infected with nonpathogenic spotted fever group rickettsiae, the growth of rickettsiae was restricted. Autophagy was suggested to be contributed to this restriction. Moreover, when the infected cells were superinfected with pathogenic rickettsiae, the growth of the nonpathogenic rickettsiae were induced. We speculated the possibility that the pathogenic rickettsiae generate a restriction factor(s) of autophagy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：リケッチア、飢餓応答、昆虫、細菌、微生物、オートファジー、病原性、増殖

1. 研究開始当初の背景

(1) リケッチアの宿主トロピズム；

リケッチアは、ベクターには共生的に持続感染し、ヒトには急性感染して病原性を示す。すなわち、リケッチアは、ベクター内で生存を続け、動物あるいはヒトへの感染源となる。

リケッチアを媒介するベクターはリケッチアの群により大きく異なり、発疹チフス群リケッチア（TGR）では昆虫綱に属するシラミ、ノミであるのに対し、紅斑熱群リケッチア（SFGR）ではクモ綱のマダニ、小型ダニである。リケッチアの宿主ベクター特異性は、細胞レ

ベルで成立しており、マダニ細胞で SFGR は増殖するが、TGR は増殖抑制が起り、昆虫細胞ではその逆になっていることが明らかになってきた (Uchiyama, Ann NY Acad Sci 1063:215-221, 2005; Uchiyama, Proc 16th Int Microsc Congr 1:408, 2006)。

(2) SFGR のマダニにおける生存戦略；

マダニはそのライフサイクルにおいて三回吸血し、その都度、幼虫から若虫に、若虫から成虫に脱皮・変態し、成虫は産卵を行う。ところが、年余に渡り吸血のチャンスが訪れないことも多く、次の吸血までの期間が長びくと、マダニは飢餓状態となる。そのような環境でも、マダニに共生するリケッチアは、生存を続けてヒトへの感染源となることが知られていた。

(3) SFGR の飢餓応答；

細菌には種々の環境応答蛋白質があり、レセプター、シグナル伝達系、酵素、膜蛋白質などが、ネットワークを形成して機能している。低温・高温・乾燥・飢餓などの過酷な条件下では、細菌は、転写・翻訳を調節して生存を確保することが必要になる。例えば、飢餓状態に反応して SpoT ファミリー蛋白質が発現し、それによりグアノシン四リン酸が産生されて RNA 合成を阻害する。また、トキシン・アンチトキシン系も mRNA 合成の阻害により蛋白質合成を抑制し、栄養源を節約する。リケッチアには多くの *spoT* パラログが存在し、トキシン・アンチトキシン系も存在することが、ゲノム解析により確認されていた (Roverly et al, Res Microbiol 156:211-218, 2005; Ogata et al, PLoS Biol 3(8):e248, 2005)。また、細菌は過酷な環境下では転写・翻訳の不全が起りやすく、産生された不完全な mRNA や蛋白質が生存に悪影響を及ぼすことになる。このためこれらの処理系が存在する。トランス翻訳産物のプロテアーゼ分解などがその一例である (カウロバクター同様、リケッチアの tmRNA も二つの断片から成っており、同一オペロン内で介在配列の上流(5'側)に 3'側断片が、下流(3'側)に 5'側断片が位置し、転写後に介在配列が切り出され、二つの RNA 断片が塩基対を介してひとつの tmRNA になることが明らかとなっていた [Keiler et al, Proc Natl Acad Sci USA 97:7778-7783, 2000; Ogata et al, Genome Res 12:808-816, 2002])。

(4) リケッチア生存とトレハロース；

昆虫やマダニ等の節足動物の血糖はトレハロースである。ある種の昆虫では低温・乾燥条件下でトレハロースの産生が盛んになり、細胞中のトレハロース濃度が高まって、細胞を凍結・乾燥から保護する作用があることが知られている (Asahina and Tanno, Nature 204:1222, 1964; Sakurai et al, Proc Natl Acad Sci USA 105:5093-5098, 2008)。

われわれのこれまでの解析により、リケッチアを緩衝液中で長期間保温した場合、トレハロースを含む緩衝液中でのリケッチアの生残率は他の糖を含む緩衝液中でのそれに比べ有意に高いことが明らかとなっていた (内山ら, 第 81 回日本細菌学会総会, 2008)。飢餓状態のマダニ細胞中ではトレハロースの産生が増強されて、リケッチアの生残率を高めるのに寄与しているのではないかと推測した。

2. 研究の目的

偏性細胞内寄生細菌・リケッチアはマダニ等の媒介節足動物 (ベクター) 中で共生的に生存し、経卵伝播する。通常、ベクターは吸血のチャンスを得るまで、飢餓状態で年余にわたり生残するが、リケッチアはベクターの飢餓状態にも対応して生存を続け、哺乳動物への感染源となる。本研究ではこのベクター内の飢餓環境におけるリケッチア生残のための応答機構を、培養細胞レベルで分子生物学的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 節足動物由来細胞への飢餓誘導と飢餓状態のモニター；

昆虫細胞 (NIAS-AeA1-2) あるいはマダニ細胞 (DALBE3、ISE6) を培養し、アミノ酸枯渇により誘導されるオートファジー関連遺伝子の発現状態で飢餓状態の成立をモニターすることを試みた。ヒトあるいはラットの抗 Atg8 抗体、抗 LC3 抗体によりこれらの細胞のオートファジー関連蛋白質をモニターした。

(2) マダニのオートファジー関連蛋白質 Atg12 に対する抗体の作製；

マダニ (*Dermacentor albipictus*) 由来 DALBE3 細胞でのオートファジーをモニターする目的で、*D. albipictus* の Atg12 (DaAtg12) に対する抗体を作製した。DALBE3 細胞より *D. albipictus* ゲノム DNA を抽出し、*Hemaphysalis longicornis* マダニの Atg12 遺伝子を元に設計したプライマーを用いて DaAtg12 の遺伝子 DNA を増幅した。発現ベクター pGEX-6P-3 を用いて組換え DaAtg12 を作製した。これを抗原として、家兔を免疫して抗体を作製した。

(3) リケッチアの病原性とオートファジー；

マダニ細胞、ほ乳動物細胞 (Vero, HeLa) に病原性あるいは非病原性の SFGR を感染させ、リケッチア増殖動態を調べた。また、オートファジー機構の関与をウエスタンブロット法、電子顕微鏡観察等により調べた。また、それらを共感染した場合の増殖動態、オートファジーの関与についても同様に調べた。

4. 研究成果

(1) 節足動物由来細胞への飢餓誘導と飢餓状態のモニター；

昆虫細胞、マダニ細胞を培養し、アミノ酸を枯渇させた。ヒトあるいはラットの抗 Atg8 抗体、抗 LC3 抗体によりこれらの細胞のオートファジー関連蛋白質をモニターすることを試みたが、これらの細胞の抗原との交差反応性が弱く、検出出来なかった。

(2) マダニのオートファジー関連蛋白質 Atg12 に対する抗体の作製；

組換え DaAtg12 を精製し、これを抗原として、家兔を免疫して抗体を作製した。

(3) 病原性、非病原性 SFGR の哺乳動物細胞およびマダニ細胞における増殖動態；

マダニ細胞、ほ乳動物細胞に非病原性の紅斑熱群リケッチアを感染させると、リケッチアの増殖が抑制されており、持続感染が成立した（図 1）。ウエスタンブロット法、電子顕微鏡観察等によりオートファジーが増殖抑制に関与していることが示唆された（図 2, 3）。また、この感染細胞に病原性株を重感染すると病原性株同様、非病原性株の増殖も惹起されることが示された。

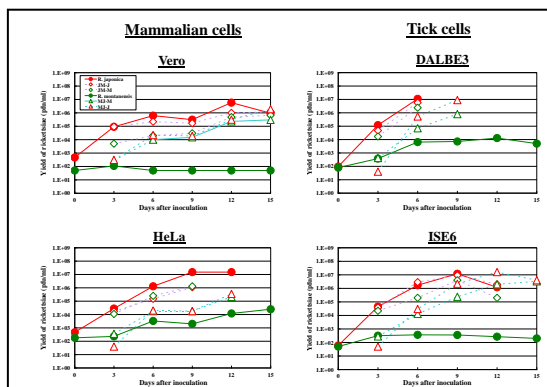


図 1. 哺乳動物細胞およびマダニ細胞における病原性 SFGR, *R. japonica* (J) および非病原性 SFGR, *R. montanensis* (M) の増殖動態。J 単独=赤丸。J 感染 3 日目に M 感染；中抜赤菱型=J, 中抜緑菱型=M。M 単独=緑丸。M 感染 3 日目に J 感染；中抜赤三角=J, 中抜緑三角=M。

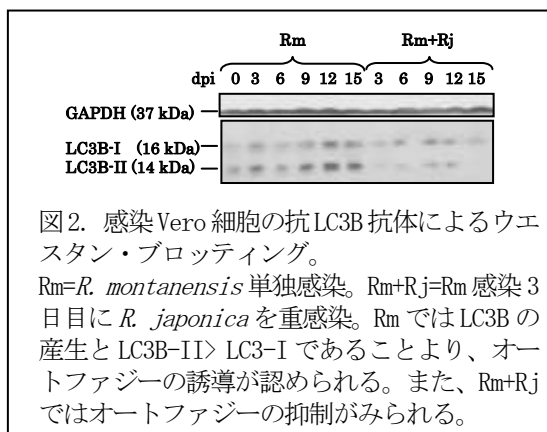


図 2. 感染 Vero 細胞の抗 LC3B 抗体によるウエスタン・ブロッティング。Rm=*R. montanensis* 単独感染。Rm+Rj=Rm 感染 3 日目に *R. japonica* を重感染。Rm では LC3B の産生と LC3B-II > LC3B-I であることより、オートファジーの誘導が認められる。また、Rm+Rj ではオートファジーの抑制がみられる。

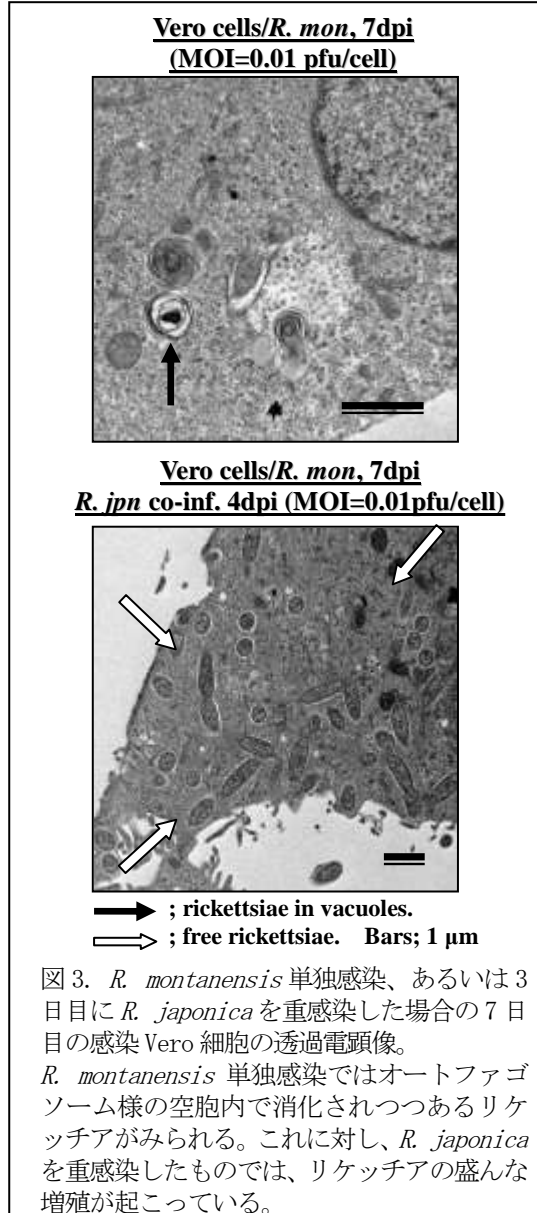


図 3. *R. montanensis* 単独感染、あるいは 3 日目に *R. japonica* を重感染した場合の 7 日目の感染 Vero 細胞の透過電顕像。*R. montanensis* 単独感染ではオートファゴソーム様の空胞内で消化されつつあるリケッチアがみられる。これに対し、*R. japonica* を重感染したものは、リケッチアの盛んな増殖が起こっている。

これらから、リケッチアのマダニ細胞内持続感染とオートファジーとの関係の重要性が示唆された。今後、作製した抗体を用いて飢餓状態をモニターし、飢餓応答により発現する遺伝子群とリケッチアの生残との関連を明らかにする。

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 3 件)

- ① Uchiyama, T. and Fujita, H. 2012. Coinfection of mammalian and tick cells with pathogenic and nonpathogenic spotted fever group rickettsiae. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 23: 17461 - DOI: 10.3402/mehd.v23i0.17461 査読有

- ② Uchiyama, T. 2012. Restriction of the growth of a nonpathogenic spotted fever group rickettsia. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 64:42-47. 査読有
- ③ 内山恒夫 2010. 日本および東南アジアに見られる種々のリケッチア症の血清学的鑑別診断法の開発. 財団法人大山健康財団年報 35:14-17. 査読無

[学会発表] (計 16 件)

- ① 小川基彦、内山恒夫、安藤秀二、2012. 3. 28. 抗菌薬によるつつが虫病リケッチアおよび Q 熱リケッチアの細胞培養系からのマイコプラズマ汚染の除去. 第 85 回日本細菌学会総会、長崎ブリックホール (長崎市)
- ② 内山恒夫、小川基彦、藤田博己、2012. 3. 27. 非病原性紅斑熱群リケッチアの哺乳動物細胞における増殖抑制. 第 85 回日本細菌学会総会、長崎ブリックホール (長崎市)
- ③ 森田裕司、内山恒夫、藤田博己、2012. 2. 12. 日本紅斑熱に対するバンコマイシンとホスホマイシンの効果の検討. 第 4 回日本リケッチア症臨床研究会・第 18 回リケッチア研究会合同研究発表会、大阪クリスタルタワー (大阪市)
- ④ Uchiyama, T., and Fujita, H. 2011. 11. 22. Coinfection of mammalian and tick cells with pathogenic and nonpathogenic spotted fever group rickettsiae. The Joint Meeting of the 17th International Symposium on Gnotobiology and the 34th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease.
- ⑤ Ogawa, M., Fukasawa, M., and Uchiyama, T. 2011. 9. 8. Infection with the obligated intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi*, a causative agent of scrub typhus facilitates formation of lipid droplets in L-929, mouse fibroblast cells. 13th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo, Japan.
- ⑥ Uchiyama, T., and Ogawa, M. 2011. 9. 7. Coinfection of pathogenic and nonpathogenic rickettsiae. 13th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo, Japan.
- ⑦ Uchiyama, T., Kishi, M., and Ogawa, M. 2011. 6. 6. Restriction of the growth of a nonpathogenic spotted fever group rickettsiae. 6th International meeting on rickettsiae and rickettsial diseases. Heraklion, Greece.
- ⑧ 内山恒夫、岸 真帆美、小川基彦、2011. 1. 15. 非病原性リケッチア株の培養細胞における増殖抑制. 第 3 回日本リケッチア症臨床研究会・第 17 回リケッチア研究会合同研究発表会、大津市民会館 (大津市)
- ⑨ 小川基彦、深澤征義、内山恒夫、2011. 1. 15. つつが虫病リケッチア感染による脂肪滴形成に関する研究~第一報~. 第 3 回日本リケッチア症臨床研究会・第 17 回リケッチア研究会合同研究発表会、大津市民会館 (大津市)
- ⑩ 小川基彦、内山恒夫、2011. 1. 15. つつが虫病リケッチア培養系からの抗菌薬によるマイコプラズマ汚染の除去の試み. 第 3 回日本リケッチア症臨床研究会・第 17 回リケッチア研究会合同研究発表会、大津市民会館 (大津市)
- ⑪ 内山恒夫、岸 真帆美、小川基彦、2010. 11. 9. 非病原性リケッチア *Rickettsia montanensis* の増殖制御機序. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、阿波銀ホール (徳島市)
- ⑫ 小川基彦、大内史子、萩原健一、松谷峰之介、内山恒夫、2010. 3. 27. 病原性の異なる *Orientia tsutsugamushi* の発現タンパク質の 2 次元電気泳動による比較・解析. 第 83 回日本細菌学会総会、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑬ 内山恒夫、岸 真帆美、小川基彦、2010. 3. 27. リケッチアの重感染. 第 83 回日本細菌学会総会、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑭ 小川基彦、大内史子、萩原健一、松谷峰之介、内山恒夫、2009. 11. 7. 病原性の異なる *Orientia tsutsugamushi* の発現タンパク質の 2 次元電気泳動による比較・解析—第一報—. 第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会、国立感染症研究所 (東京都)

- ⑮ 内山恒夫、岸 真帆美、小川基彦、2009.10.27、リケッチア Sca 外膜蛋白質発現大腸菌の種々の細胞への付着侵入能. 第57回日本ウイルス学会学術集会、都市センターホテル（東京都）
- ⑯ 内山恒夫、岸 真帆美、2009.7.4、リケッチア Sca3 外膜蛋白質の機能解析. 第24回中国四国ウイルス研究会、ピュアリティまきび（岡山市）

〔図書〕（計1件）

- ① 内山恒夫、リケッチア「紅斑熱群」, 新居士郎・倉田 毅・林 英生・本田武司・小田 紘・松本 明 編, 病原細菌・ウイルス図鑑、北海道大学出版会、北海道、印刷中.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 恒夫 (UCHIYAMA TSUNEO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：90151901

(2) 研究分担者

小川 基彦 (OGAWA MOTOHIKO)

国立感染症研究所・ウイルス一部・主任研究官

研究者番号：10322710

(3) 連携研究者

なし