

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14日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590461

研究課題名（和文）トリパノソーマ感染宿主細胞における酸化ストレス応答とアポトーシス制御解析

研究課題名（英文） Regulation of oxidative stress and apoptosis in *Trypanosoma cruzi* infected cells

研究代表者

嶋田 淳子（SHIMADA JUNKO）

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：20211964

研究成果の概要（和文）：*Trypanosoma cruzi* 感染宿主細胞では活性酸素種の産生が起こり、中でも活性窒素（NO）産生および活性窒素合成酵素（iNOS）の発現上昇が明らかとなった。活性酸素種阻害剤を添加すると、原虫感染細胞におけるアポトーシス抑制が解除されたことから、本アポトーシス抑制にNOなどの活性酸素種が関与していることが明らかになった。また、感染により宿主アポトーシス抑制因子 c-FLIP にニトロソ化反応が起きることがわかった。

研究成果の概要（英文）：In *Trypanosoma cruzi* infected cells, the production of reactive oxygen species including nitric oxide (NO) was increased and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene was up-regulated. The inhibition of apoptosis in infected cells was reduced by the addition of NOS inhibitors. Furthermore, cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP), an apoptosis inhibitory protein, was nitrosylated in *T. cruzi* infected cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子寄生虫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：感染症、応用微生物

1. 研究開始当初の背景

生体内で活性酸素種、活性窒素種は物質や薬物代謝、生体防御の両面から不可欠の分子

種である。宿主は侵入する外来病原体を排除するために、感染局所で活性酸素種や一酸化窒素（NO）を生成している。これらは病原体

を殺菌する一方、宿主細胞に対しても有害であるため、過剰に産生されると炎症反応が現れ病態を引き起こす。従って活性酸素種やNOは両刃の剣の性質を持ち、その制御はきわめて重要である。

病原微生物感染により活性酸素や活性窒素種が生成し、宿主に酸化ストレスを与えることが報告されている。ウイルス感染ではスーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) やNO、ペルオキシナイトライト ($ONOO^-$)、細胞内寄生細菌である結核やリステリアではNOが産生される。寄生原虫 *Trypanosoma cruzi* においても活性酸素種やNOが生体防御に重要であることが知られている。in vivoの実験では、NO合成酵素の1つである誘導型NOS (iNOS) 遺伝子ノックアウトマウスで原虫感染により腸管の脱神経がみられるが (Arantes et al. Am J Pathol, 2004)、原虫の排除はできないことが報告されている (Cummings & Tarleton Infect Immun, 2004)。

これまでに、我々は *T. cruzi* 感染に対する宿主細胞側の応答として細胞死という観点から解析を行っている。*T. cruzi* 感染宿主細胞では death receptor を介するアポトーシスが抑制され、宿主抑制因子 cellular FLIP inhibitory protein (c-FLIP) が機能的にはたっていることを明らかにしてきた。c-FLIPの発現上昇機構を解析する過程で、本タンパク質がニトロソ化という分子修飾を受け、ユビキチン化による分解経路が抑制される可能性が示唆された。また、c-FLIPは細胞内で複数の機能を持つタンパク質であることが知られており、*T. cruzi* 感染におけるアポトーシス制御と活性酸素種による制御の関連を解析することは興味深いと考えられる。

2. 研究の目的

T. cruzi はシャーガス病の病原体として重要であるが、本原虫感染による宿主側の応答については解明されていない点が多く、病態を理解する上で寄生虫と宿主両者を統合的に解析する基盤研究が必要である。応募者らは、原虫感染により宿主はどのように応答してそれを排除しようとしているのか、またそれに対して原虫はどのような方法で排除されずに生き残ろうとしているのかについて細胞レベル、分子レベルで解析し、宿主-寄生虫相互作用を解明していきたいと考えている。これまで *T. cruzi* 感染に対する宿主細胞側の応答として細胞死という観点から解析を行っており、その過程で宿主細胞が酸化ストレスを受けている可能性が示唆さ

れた。そこで、本研究では原虫感染による酸化ストレス応答について解析を行う。宿主細胞における活性酸素、活性窒素種産生ならび活性窒素合成酵素の発現について調べる。また、原虫感染細胞における酸化ストレスとアポトーシスの関連についても考察し、c-FLIPの分子修飾を含め、原虫感染と酸化ストレスとアポトーシスを理解することを目的とする。

3. 研究の方法

① *T. cruzi* 感染細胞におけるNO産生

ヒト由来線維肉腫細胞株 HT1080 および単球細胞株 THP-1 細胞に *T. cruzi* (Tulahuene) 株を感染させ、一定時間後に培養細胞上清を取り、NO産生を測定した。

② *T. cruzi* 感染細胞におけるiNOS発現の測定

HT1080 および THP-1 細胞に *T. cruzi* を感染させ、一定時間後にRNAを抽出しcDNAに転換した。リアルタイムPCRを用いてiNOSの発現を定量した。

③ 原虫感染細胞におけるニトロソ化タンパク質の検出

HT1080 細胞に *T. cruzi* を感染させ3-4日後に細胞のライセートを作製した。Biotin switch assay法により、ニトロソ化タンパク質を検出し、c-FLIPを含むどのような分子がニトロソ化されるか解析した。抗ニトロソシステイン抗体を用いて、免疫沈降を行い、感染および非感染細胞のニトロソ化タンパク質を網羅的に解析した。免疫沈降されたタンパク質をSDS電気泳動後、ゲルから切り出し、トリプシン処理後プロテオーム解析を行い、ニトロソ化されたタンパク質を同定した。

④ 原虫感染細胞におけるアポトーシス抑制と活性酸素の関連解析

HT1080 細胞に *T. cruzi* を感染させ3-4日後に、抗Fas抗体(CH11)でアポトーシスを誘導した。その際、活性酸素の阻害剤であるN-メチルモノアルギニン(NMMA)を添加して実験を行った。アポトーシス誘導24時間後に細胞を集め、FITC標識活性型カスパー-3抗体を添加しフローサイトメトリーによりアポトーシスを起こした細胞の割合を測定した。また同時に、*T. cruzi* 感染マウスから得た血清を用いて感染細胞をAPCで蛍光標識し、感染、非感染細胞を区別した。

⑤ c-FLIPと相互作用する原虫側因子の探索

c-FLIPと相互作用する原虫側の因子を探索するため、c-FLIP発現細胞の樹立を試みた。しかしながら、c-FLIP全長を発現させるのが

困難であったため、N末側のDED領域とC末側のpseudo-caspase領域を含む領域をPCRで増幅し、動物細胞発現ベクターに連結した。その遺伝子をHT1080細胞にトランスフェクションし、pseudo-caspase領域を発現した細胞のクローン化を行った。クローン化した細胞でc-FLIPの各領域が発現しているかどうか、ウエスタンブロット法で確認した。また、クローン化した細胞からライセートを作製し、抗myc抗体を用いてpull downアッセイを行った。共沈してくるタンパク質の明確なバンドがみられなかったため、培養時にフォトラベルを行い、UVクロスリンク法により相互作用するタンパク質を共沈する方法を検討した。

4. 研究成果

*T. cruzi*を感染細胞では、感染6時間後からNO産生の上昇が認められ、9-24時間後も高いレベルが維持されていた(図1)。また、iNOS遺伝子の発現は感染細胞で6および9時間後に上昇した(図2)。この結果は、原虫感染により活性酸素種の産生が起こることを示唆している。この反応はどちらの宿主細胞でも認められた。

図1

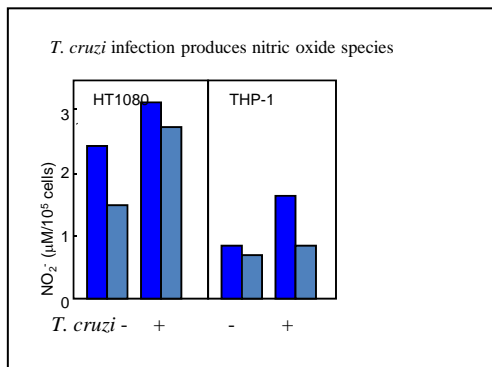
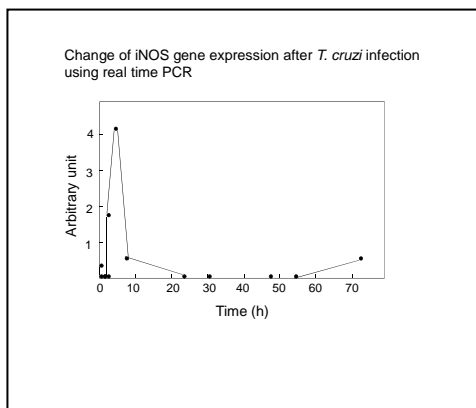
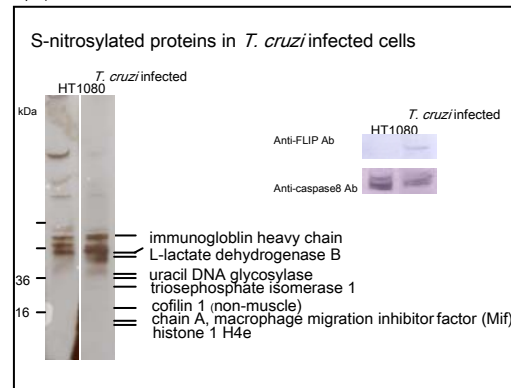


図2



次に、原虫感染細胞におけるニトロソ化について解析を行った。ヒト由来培養細胞HT1080に*T. cruzi*を感染させ、biotin switchアッセイを行い、ニトロソ化されたタンパク質の網羅的解析を試みた。以前の研究結果から、*T. cruzi*感染細胞では宿主アポトーシス抑制因子c-FLIPがnitrosylationされることが示されている。しかし、この反応は可逆的であるため、結合したNOがサンプル調整中にはずれてしまう可能性が考えられた。そこで、nitrosylationされたタンパク質が安定に検出できる方法を検討した。感染細胞ライセートにSDSを加えたサンプルバッファーを添加すると、NOがはずれてしまうことがわかり、種々の条件を検討した。その結果、感染細胞では複数のニトロソ化タンパク質が検出され、その中にはc-FLIP、カスプース-8が含まれていることが明らかとなった。またプロテオーム解析の結果、感染細胞では解答系酵素の中にニトロソ化されたタンパク質がより高いレベルで検出された(図3)。

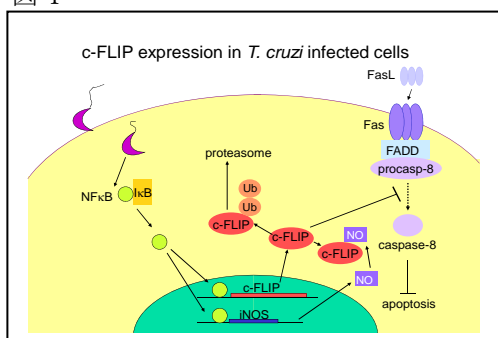
図3



次に、原虫感染における宿主の一酸化窒素(NO)産生とアポトーシスの関連を調べる目的で、*T. cruzi*感染細胞にNOS合成酵素の阻害剤であるL-NMMAを添加し、アポトーシス抑制が回復するかについて検討した。アポトーシス誘導前では感染、非感染細胞いずれも活性型カスプース-3は5%程度であった。誘導後、非感染細胞では活性酸素阻害剤の有無で差は認められず、いずれも55-58%であった。一方感染細胞では、アポトーシスが抑制され、阻害剤を加えない場合には12.3%、阻害剤添加では18.5%であった。阻害剤を添加した場合にアポトーシスが誘導される細胞がやや上昇したことから、原虫感染細胞では、活性酸素によりアポトーシス抑制が解除される傾向が認められた。以上より、*T. cruzi*感染細胞では宿主細胞内でNOの産生が起き、iNOS阻害剤によりアポトーシス抑制が解除される

ことから、活性窒素が本抑制制御に関与している可能性が示唆された。図4にそのスキームのモデルを示す。

図4



宿主細胞内レドックスバランスによるアポトーシス制御機構についてはさらなる解析が必要とされる。

次に、c-FLIPと相互作用する原虫側の因子を探索するため、c-FLIP発現細胞の樹立を試みた。c-FLIP全長を発現させるのが困難であったため、N末側のDED領域とC末側のpseudo-caspase領域を含む領域をPCRで増幅し、動物細胞発現ベクターに連結した。その遺伝子をHT1080細胞にトランスフェクションし、pseudo-caspase領域を発現した細胞のクローン化を行った。Pseudo-caspaseはmycおよびFLAGのtag付タンパク質として発現され、ウエスタンブロットで確認したところ予想したサイズのバンドが検出され、発現細胞の樹立に成功した。DED領域発現細胞については現在クローン化を行っているところである。発現細胞を用いて、原虫と相互作用するタンパク質を探索したが明確なバンドが得られず、サンプル調整の際に相互作用するタンパク質がはずれてしまう可能性が考えられた。そこで、pseudo-caspase発現細胞に*T. cruzi*を感染させ、UVクロスリンクを行った後にライセートを作製した。原虫感染および非感染発現細胞からUVクロスリンク後にそれぞれライセートを調整し、抗myc抗体を用いて免疫沈降を行い、SDS電気泳動およびウエスタンブロット法を用いてc-FLIPのpseudo-caspase領域と相互作用するタンパク質の検出を試みている。UV照射量、照射時間について条件検討を行い、実験系を確立中である。

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4件)

① Sato M, Yoshimura S, Hirai R, Goto A,

Kunii M, Atik N, Sato T, Sato K, Harada R, Shimada J, Hatabu T, Yorifuji H, Harada A. The role of VAMP7/TI-VAMP in cell polarity and lysosomal exocytosis in vivo.

Traffic 12:1383-1393 (2011).

査読有

② Suradji E, Hatabu T, Kobayashi K, Yamazaki C, Abdulah R, Nakazawa M, Nakajima-Shimada J, Koyama H. Selenium-induced apoptosis-like cell death in *Plasmodium falciparum*.

Parasitology 19:1-11 (2011).

査読有

③ Toma H, Hatabu T, Vanisaveth V, Mannoor MK, Watanabe H, Li C, Kobayashi. J. Phompida S, Kano S, and Sato Y. Efficacy of mefloquine treatment and genetic profiles in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Lao PDR. Southeast Asian J Trop Med Public Health 42: 759-763 (2011)

査読有

④ Shimada J., Hatabu T. *Trypanosoma cruzi* infection induces nitric oxide production and S-nitrosylation of cellular FLIP in host cells. . XII International Congress of Parasitology ICOPA, Monduzzi editore, Medimond s.r.l. 12:117-120 (2010)

査読無

[学会発表] (計3件)

① 高橋 千由紀、畑生 俊光、嶋田 淳子 南米型トリパノソーマ感染細胞におけるオートファジーとアポトーシスとの関連性の解析 第48回関東甲信地区医学検査学会 2011. 10. 30 前橋市民文化センター (群馬)

② 細井友夏里、畑生俊光、内山奈穂子、嶋田淳子 真菌由来代謝産物のトリパノソーマ増殖抑制効果 日本生薬学会第57回年会 2010. 9. 25. 徳島文理大学徳島キャンパス (徳島)

③ Shimada J., Hatabu T. *Trypanosoma cruzi* infection induces nitric oxide production and S-

nitrosylation of cellular FLIP in host cells.

XII International Congress of Parasitology ICOPA Aug. 25, 2010メルボルン国際会議場（メルボルン、オーストラリア）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

①名称：抗トリパノソーマ剤およびトリパノソーマ治療薬

発明者：嶋田淳子、久保原禪

権利者：国立大学法人群馬大学

種類：特願

番号：2010-163039

出願年月日：2010. 7. 20

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 淳子 (SHIMADA JUNKO)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：20211964

(2) 研究分担者

畑生 俊光 (HATABU TOSHIMITSU)

群馬大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：60344917

(3) 連携研究者

なし