

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659120

研究課題名(和文)細菌性病原因子による細胞癌化機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of carcinogenesis by bacterial pathogenic factor

研究代表者

東 秀明(Higashi, Hideaki)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：20311227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：常在腸内細菌感染は宿主免疫機構に依存し腫瘍形成を誘導することから、腫瘍ウイルス感染と同様に細菌感染も潜在的な発癌リスクファクターとなることが予想された。本課題ではChlamydia trachomatis Tarp分子の機能解析を通して、細菌感染が細胞増殖に与える影響を明らかにすることを目的とし、ヒト化 C. trachomatis tarp遺伝子作出し、これまでに困難されてきた動物細胞におけるTarp異所性発現系の構築に成功した。また、人工遺伝子を用いた遺伝子改変動物作製へのアプローチを行った。

研究成果の概要(英文)：As infection with intestinal residential bacteria depends on the host immune system and induces tumor formation, bacterial infection was predicted to be a potential risk factor of carcinogenesis, as is the case for oncoviral infection. The aim of this study was to reveal the effect of bacterial infection on cell proliferation through the functional analysis of Tarp molecules in Chlamydia trachomatis. We created a humanized C. trachomatis tarp gene and successfully constructed a system for ectopic Tarp expression in animal cells, which has been considered difficult thus far. We also studied an approach to create genetically modified animals using the humanized genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：細菌 タンパク質リン酸化

1. 研究開始当初の背景

胃癌発症と深く関わる *Helicobacter pylori* 病原因子 CagA タンパク質の分子機能解析を行い、CagA が増殖シグナル伝達系を脱制御し、腫瘍形成を誘導する細菌性癌タンパク質であることを明らかにした(1-3)。感染症と発癌という観点において、*H. pylori* と同様に一部のウイルス感染が腫瘍形成に関わることが知られている。一方、常在腸内細菌感染が宿主免疫応答機構に依存して異常な増殖シグナルを生成し、腸管における炎症を伴った腫瘍形成を誘導することが明らかにされ、また、その腫瘍形成が免疫応答を遮断することで抑制されることが報告された。この事実はウイルス感染と同様に、*H. pylori* 以外の細菌感染が潜在的に発癌のリスクファクターとなりうることを示唆しており、細菌感染を起点とした細胞癌化機構という新しい概念を提唱するものである。

2. 研究の目的

本研究は、細菌感染が宿主腫瘍形成にどのように寄与し、その腫瘍形成に関わる微生物及び宿主の分子基盤を明らかにすることを目的とし、細菌性癌タンパク質 CagA 様の病原因子の探索及び解析を進める。特に本申請課題においては、性感染症として近年感染者数が激増し、また *Human papillomavirus* (HPV) 感染を伴った子宮頸癌発症リスクを高める偏性細胞内寄生細菌 *Chlamydia trachomatis* に由来する病原因子 Tarp に着目する。*C. trachomatis* は上皮細胞に感染する際、III 型分泌機構を介して Tarp 分子を宿主細胞に注入する。興味深いことに Tarp は、*H. pylori* CagA と同様に宿主内へ移行後チロシンリン酸化を受ける分子である。Tarp は細胞内分子と直接相互作用し、宿主のアクチン構造及びアポトーシス制御機構に影響を及ぼすと考えられているが、その分子機能の全容は未だ明らかにされていない。そこで、細菌感染が宿主腫瘍形成に及ぼす影響を明らかにすることの一端として、本研究では、これまで困難とされてきたほ乳類細胞における *C. trachomatis* Tarp の異所性発現系の確立と、その分子機能の解析を目的として分子レベル及び個体レベルで検討する実験系の確立を目標とする。

3. 研究の方法

(1) Tarp 細胞内標的分子の探索およびチロシンリン酸化依存的な分子機能の検討

C. trachomatis 病原因子 Tarp は、微生物由来の Type-III 機構により宿主細胞内へ注入され、細胞内でチロシンリン酸化を受ける。このことから、Tarp は細胞内シグナル伝達

に関わる細胞内因子の機能を模倣し、シグナル制御を破綻させている可能性が予想される。これまでの研究により、Tarp と親和性を示す細胞内 SH2 分子が報告されたが、Tarp の分子活性に関しては未だ不明な点が多く残されている。そこで、Tarp 分子内に複数存在するチロシンリン酸化部位において、一つもしくは複数のリン酸化部位へ変異を導入した一連の Tarp 分子を用い、リン酸化部位の修飾が Tarp 分子機能に及ぼす影響を検討する。

野生型 Tarp およびチロシンリン酸化部位に変異を導入した一連の改変型 Tarp 分子を細胞に異所性発現させ、免疫沈降反応および質量分析機を用い、相互作用を示す細胞内タンパク質を網羅的に比較、検討する。同定された分子情報より、Tarp 生物活性発現に必要なとされる分子機構およびチロシンリン酸化が Tarp の分子機能に及ぼす影響を明らかにする。

(2) Tarp トランスジェニックマウスの作成

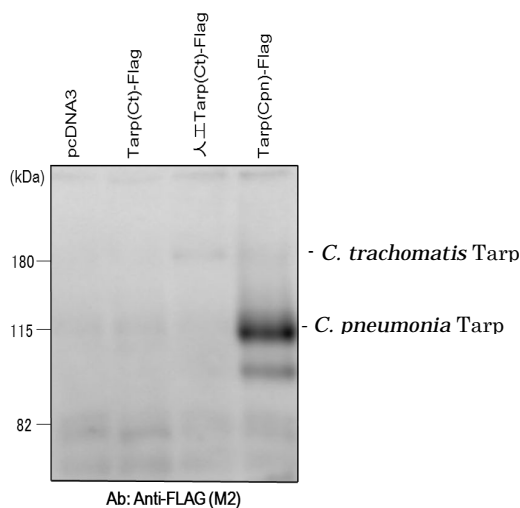
Tarp トランスジェニックマウスを用い、Tarp の発癌作用および発症機構への関与を個体レベルで検討する。個体レベルにおける Tarp の発癌への寄与およびその発症機構を解明するため、Tarp トランスジェニックマウスを作成する。ファウンダーマウスの同定は、ゲノム PCR、ウェスタンブロット等の手法を用いて検証し、Tarp の発現レベルが高いマウスを用い系統を樹立する。また、このときリン酸化耐性型 Tarp を発現する遺伝子改変マウスも併せて樹立し、チロシンリン酸化が Tarp 生物活性に及ぼす影響を個体レベルで明らかにしていく。

4. 研究成果

(1) Tarp 細胞内標的分子の探索およびチロシンリン酸化依存的な分子機能の検討

Tarp 細胞内標的分子の探索を目的として *C. trachomatis* L2 株ゲノムより *tarp* 遺伝子のクローニングを行い、大腸菌及びほ乳類細胞を利用した Tarp 異所性発現系の構築を行った。また Tarp のリン酸化依存的な機能を検討するため、Tarp 分子内の繰返し配列に存在するチロシンリン酸化部位に変異を導入した変異型 Tarp ならびに、*C. trachomatis* Trap とはリン酸化状態が区別される、*Chlamydia pneumonia* Trap 分子の発現系の構築も合わせて行った。個々のタンパク質発現系の構築に至り、免疫沈降法等を用いた Tarp の細胞内標的分子の探索を進めたところ、電気泳動解析によりリン酸化依存的に共沈殿する分子が確認された。しかしながら、共沈殿物の量的な問題から、標的分子の同定に至らなかった。その原因の一つとして、種々の発現宿主を用いた解析の結果から、

大腸菌等の原核生物細胞を宿主とした場合に比べ、ほ乳類細胞における Tarp 発現量が極めて低いことが原因と予想された。さらに、Tarp 分子の機能解析過程において、細胞内に発現させた Tarp のリン酸化現象に関し、既報と異なる事象に直面した。これらのことから、培養細胞を用いた Tarp 分子の機能解析を更に進めることとし、Tarp の細胞内発現を改善することを目的として、発現方法の再検討を進めた。*C. trachomatis* 及び *C. pneumonia* の tarp 遺伝子を用い、大腸菌、ほ乳類細胞等を利用し構築した異所性発現系の結果を解析したところ、*C. trachomatis* Tarp の発現レベルの低下は *C. trachomatis* tarp 遺伝子の配列に起因することが明らかとなった。そこで、アミノ酸配列を変えずに *C. trachomatis* tarp 遺伝子上のコドン改変を行ったヒト化 tarp 遺伝子を生設計し、その遺伝子の全合成を行なった。設計を行うに当たりコドン使用頻度をヒト細胞内タンパク質合成系に最適化し、また GC 含量を 60%程度とした。人化 tarp 遺伝子を発現系の構築に用いた結果、ほ乳類細胞における Tarp の発現レベルが改善され、人工 Tarp 遺伝子は今後の Tarp 研究に非常に有用な材料となることが示唆された。



図：ほ乳類細胞における人化 tarp 遺伝子の発現。

(2) Tarp トランスジェニックマウスの作成

個体レベルにおける Tarp の発癌への関与を明らかにするため、*C. trachomatis* L2 株 trap を用い、Tarp トランスジェニックマウスの作成準備を進めた。マウスにおける Tarp 発現の時空間的な制御を行うため、恒常的な全身発現系に加え Cre-loxP を用いた発現系ユニットを構築した。しかしながら、培養細胞を用いた解析結果で示したように、*C. trachomatis* 遺伝子を用いたほ乳類細胞で

の異所性発現系の構築は極めて困難であった。本研究計画は、リン酸化修飾に依存した Tarp 機能を個体で解析することを目的としていたが、培養細胞で得られた結果の検証が優先されると判断し、マウス作製に関して一時中断を余儀なくされた。人化遺伝子による発現量の改善が確認されたことから、Tarp トランスジェニックマウス作出に適した Tarp 遺伝子が利用可能となり、マウス作製に向けた発現ユニットの作製を進め、完了した。

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 10 件)

- Ogawa H., Ohnuma M., Squarre D., Mweene A.S., Ezaki T., Fujikura D., Ohnishi N., Thomas Y., Hang'ombe B.M., Higashi H.: Bacillus cereus from the environment is genetically related to the highly pathogenic B. cereus in Zambia. 査読有り *J VET MED SCI in press* (2015)
- Yabe J., Hamambulu P., Simulundu E., Ogawa H., Kajihara M., Mori-Kajihara A., Changula-Chitanga K., Mwase M., Mweemba-Muwowo M., Chambaro H.M., Mataa L., Hang'ombe B.M., Namangala B., Fandamu P., Sawa H., Takada A., Higashi H., Mweene A.S.: Pathological and molecular diagnosis of the 2013 African swine fever outbreak in Lusaka, Zambia. 査読有り *Trop. Anim. Health. Prod.* **47**, 459-463 (2015) doi: 10.1007/s11250-014-0732-0
- Ogawa H., Fujikura D., Ohnuma M., Ohnishi N., Hang'ombe B.M., Mimuro M., Ezaki T., Mweene A.S., Higashi H.: A novel multiplex PCR discriminates Bacillus anthracis and its genetically related strains from other Bacillus cereus group species 査読有り *PLoS One*, **10**(3): e0122004. (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0122004
- Higashi H., Kida, H.: Research Activities of Hokudai Center for Zoonosis Control in Zambia. 査読有り *Journal of Disaster Research*, **9**, 818-822 (2014)
- Iwasaki K., Sudo H., Yamada K., Higashi H., Ohnishi T., Tsujimoto T., Iwasaki N.: Effects of single injection of local anesthetic agents on intervertebral disc degeneration: ex vivo and long-term in vivo experimental study. 査読有り *PLoS One*, **9**(10): e109851. (2014)

- doi: 10.1371/journal.pone.0109851
6. Ohnishi N., Maruyama F., Ogawa H., Kachi H., Yamada S., Fujikura D., Nakagawa I., Hang'ombe B.M., Thomas Y., Mweene A.S., Higashi H.: Genome Sequence of *Bacillus anthracis* outbreak strain in Zambia, 2011. 査読有り *Genome Announc.*, **2**: e00116-14 (2014) doi: 10.1128/genomeA.00116-14
 7. Yamada K., Sudo H., Iwasaki K., Sasaki N., Higashi H., Kameda Y., Ito M., Takahata M., Abumi K., Minami A., Iwasaki N.: Caspase 3 Silencing inhibits biomechanical overload-induced intervertebral disk degeneration. 査読有り *Am. J. Pathol.*, **184**, 753-764 (2014) doi: 10.1016/j.ajpath.2013.11.010
 8. Sudo H., Yamada K., Iwasaki K., Higashi H., Ito M., Minami A., Iwasaki N.: Global identification of genes related to nutrient deficiency in intervertebral disc cells in an experimental nutrient deprivation mode. 査読有り *PLoS One* **8**: e58806. (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0058806
 9. Hayashi T., Senda M., Morohashi H., Higashi H., Horio M., Kashiba Y., Nagase L., Sasaya D., Shimizu T., Venugopalan N., Kumeta H., Noda N.N., Inagaki F., Senda T., Hatakeyama M.: Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA. 査読有り *Cell Host Microbe*, **12**, 20-33 (2012)
 10. Hang'ombe B.M., Mwansa J.C.L., Muwowo S., Mulenga P., Kapina M., Musenga E., Squarre D., Mataa L., Thomas S.Y., Ogawa H., Sawa H., Higashi H.: Human – Animal Anthrax outbreak in the Luangwa valley of Zambia in 2011. 査読有り *Trop. Doct.*, **42**, 136-139 (2012)
- molecule to develop structure-based vaccine against Anthrax, 2013年7月18日, 第60回毒素シンポジウム, 楓香荘(兵庫・穴栗市)
4. Hideaki Higashi, Control and prevention of anthrax in human and animals, 2013年6月26日, International Conference in Medicine and Public Health 2013 (ICMPH2013) “Healthy Society beyond Frontiers”, バンコク(タイ)
 5. Ohnishi Naomi, Memi Muto, Manabu Igarashi, Daisuke Fujikura, Hideaki Higashi, *De novo* designed molecule to develop structure-based vaccine against, 2013年3月18日, 第86回日本細菌学会総会, 幕張メッセ国際会議場(千葉・千葉市)
 6. 東 秀明, 「今アフリカでは ~細菌感染症の克服を目指して~」, 2013年2月10日, 市民公開講座「人獣共通感染症の克服戦略」, 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)
 7. Naomi Ohnishi, Daisuke Fujikura, Memi Muto, Manabu Igarashi, Bernard M. Hang'ombe, Hirofumi Sawa, Hideaki Higashi, Development of de novo designated molecular for structure-based Anthrax vaccine. 2013年1月23日, Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, 東京医科歯科大学(東京・文京区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 秀明 (HIGASHI, Hideaki)
 北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授
 研究者番号: 20311227

[学会発表](計7件)

1. 東 秀明, Optimal Career Decisions by Young Researchers, 2014年3月27日, 第87回日本細菌学会総会, タワーホール船堀(東京・江戸川区)
2. Hideaki Higashi, 炭疽のコントロールを目指してーアフリカにおける炭疽サーベイランスとワクチン開発ー Control and prevention of anthrax in human and animals, 2013年9月26日, 第13回日本バイオセーフティ学会総会, 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)
3. 大西 なおみ, 武藤 芽未, 藤倉 大輔, 五十嵐 学, 東 秀明, *De novo* designed