

平成21年 5月26日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590448

研究課題名 (和文) 偏性細胞内寄生細菌・リケッチアの宿主特異性に関する分子種の解明

研究課題名 (英文) A study on the molecules participating in the host-specificity of rickettsiae, one of the obligate intracellular 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：リケッチアの宿主細胞への付着侵入は全てのリケッチア群と細胞種の組み合わせで起こるが、増殖能はリケッチア群のベクター特異性と一致しており、細胞レベルで宿主特異性が決定していた。また、リケッチアは rOmpB/Ku70 相互作用を介して動物細胞に付着し、付着部位にチロシンリン酸化蛋白質、ホスホイノシチド 3-キナーゼ依存的活性、微小管などの働きでアクチン重合が起こり、クラスリン、カベオリン依存的エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが明らかになった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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： 宿主特異性、リケッチア、紅斑熱群、発疹チフス群、Sca、Ku70、マダニ、昆虫

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) リケッチアの宿主細胞への付着侵入；

偏性細胞内寄生細菌・リケッチアの増殖に宿主細胞への付着侵入は必須の過程である。通性細胞内寄生細菌・サルモネラ、赤痢菌、リステリアについては詳細に解明されていたが、リケッチアについての研究は少なかった。研究開始当初、紅斑熱群リケッチア (SFGR) *Rickettsia conorii* の哺乳動物細胞への付着侵入に伴う初期シグナル伝

達機構の一部が解明され、Cdc42、ホスホイノシチド 3-キナーゼ、c-Src、コータクチン、チロシンリン酸化蛋白質等が関与する経路の相互作用により Arp2/3 複合体の活性化が制御され、局所的にアクチン再配列が誘導されて起ることが分かった。

## (2) リケッチア外膜蛋白質の機能；

リケッチアゲノムは進化的に退縮傾向にあり、遺伝子の崩壊・消失が緩徐に進行している。これと対照的に、他の細菌に比べ

目立ってコピー数の多い遺伝子群も存在する。リケッチアが現在の宿主および環境に適応するためにこれらの蛋白質が特に重要であったと推測される。リケッチアゲノム上で3つ以上のパラログを持つ6遺伝子群のうち、他の細菌と比較して有意に多いパラログを持つのは *t1e*, *spoT*, *proP*, *ampG*, *sca* の5遺伝子群である。このうち宿主細胞への付着侵入・増殖に直接関すると推測されるのは *sca* 遺伝子群である。

リケッチアは主に SFGR と発疹チフス群リケッチア (TGR) の2群に大別されるが、SFGR には6つの Sca 外膜蛋白質遺伝子群 (*sca0* [=ompA], *sca1-3*, *sca4* [=ps120], *sca5* [=ompB]) が存在する。これらのうち *sca3* は一部断片のみであるため、Sca1, Sca2, PS120, rOmpB, rOmpA の5つの蛋白質が産生されると推測される。TGR に関して *sca2* は一部断片のみであり、実際には *sca1*, *sca3*, *sca4*, *ompB* の4パラログが存在することになる。このうち、*sca1*, *sca4* は分割型 ORF を持つ。rOmpA, rOmpB が易熱性のオートトランスポーターであり、それぞれ単独で付着侵入能を有すること、PS120 が実際には外膜上には局在せず、細胞内に存在する耐熱性の蛋白質であることが、それまでの我々の解析により示されていた。研究開始当初、上記の解析以外に外膜蛋白質群の性状・機能および相互作用する宿主因子についての重要な研究は行われておらず、本研究がリケッチアの宿主特異性、病原性を解明する上で重要な位置を占めていた。

## 2. 研究の目的

リケッチアのゲノム解析により、宿主細胞への付着侵入・増殖過程における外膜蛋白質 RickA および Sca 蛋白質群 (Sca1-4, rOmpB, rOmpA) の重要性が推測された。リケッチアの宿主特異性の分子機構を解明する目標に向けて、本研究では、Sca 外膜蛋白質群の各蛋白質、および RickA 外膜蛋白質が種々の宿主細胞におけるリケッチアの付着侵入過程

および増殖過程にどのように関与するかを明らかにし、また、リケッチアの外膜蛋白質と相互作用して付着侵入に関与する宿主因子とその機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) リケッチアの各種細胞での付着・増殖；

下記の種々の細胞に SFGR の *R. japonica*, *R. conorii*, TGR の *R. prowazekii*, *R. typhi* を接種し、その付着と増殖を調べた。

(i) TGR ベクターのシラミ、ノミの株化細胞が存在しないため、同じ昆虫類の蚊由来の NIAS-AeA1-2 細胞。(ii) SFGR ベクターのマダニ由来 DALBE3 細胞、ISE6 細胞。(iii) ヒトでの標的の血管内皮細胞の ECV304 細胞。

### (2) 各 Sca, RickA 外膜蛋白質を菌体表面に発現する組換え大腸菌の作製；

*R. conorii* (SFGR) および *R. prowazekii* (TGR) の *rickA*, *sca1-5* の各遺伝子をそれぞれ発現ベクター pET-22b(+) の *pelB* リーダー配列の下流に挿入した。これらのベクターで大腸菌 BL21 (DE3) をトランスフォームし、組換え大腸菌を作製した。発現誘導により菌体表面に発現する各組換え蛋白質を蛍光標識し、その発現の有無を調べた。

### (3) 組換え大腸菌の各種細胞への付着侵入能およびその動態の解析；

① 各組換え蛋白質を発現する大腸菌を各細胞に接種し、その付着侵入能を組織染色、蛍光染色により解析した。

② 透過型および走査型電子顕微鏡を用い、組換え大腸菌を接種した細胞に惹起される形態学的変化を経時的に観察し、リケッチア付着侵入時との比較検討を行った。

### (4) 付着侵入に関与する宿主因子の解析；

哺乳動物細胞に Ku70 の si-RNA を発現させて Ku70 の発現を抑制し、付着に及ぼす効果を調べた。また、c-Cbl, クラスリン, カベオリン-2 等のエンドサイトーシスに関連する宿主蛋白質の発現を各 si-RNA により抑制し、その効果を調べた。

### (5) 解析結果の総括；

結果に基づき、リケッチアの付着侵入過

程においてリケッチア外膜蛋白質および種々の宿主因子がどのように関与しているかについて総括し、考察を加えた。

#### 4. 研究成果

リケッチアと宿主（哺乳動物およびベクターのダニ、昆虫、）との関係、すなわち、リケッチアの宿主特異性を明らかにする目的で、まず各細胞種に対する各リケッチアの付着侵入能、増殖能を調べた。その結果、付着侵入は種々のリケッチアと細胞種の全ての組み合わせで起こるが、増殖能はベクターとリケッチア群との関係と一致しており、昆虫由来細胞では TGR が増殖して、SFGR の増殖抑制がみられ、これとは逆にマダニ由来細胞では SFGR が増殖して、TGR の増殖抑制がみられた（図 1）。

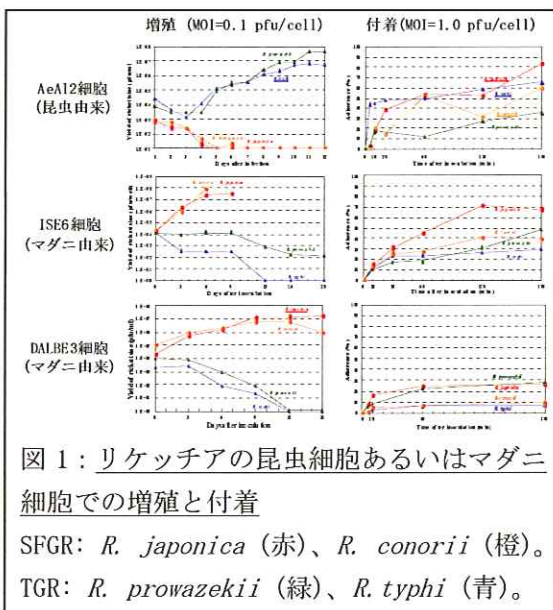


図 1：リケッチアの昆虫細胞あるいはマダニ細胞での増殖と付着  
SFGR: *R. japonica* (赤)、*R. conorii* (橙)。  
TGR: *R. prowazekii* (緑)、*R. typhi* (青)。

これらの結果から、宿主特異性が細胞レベルで研究できることが示されたため、細胞レベルでの宿主特異性に関与する分子種を解明することを目的として研究を進めた。RickA 外膜蛋白質あるいは Sca 外膜蛋白質群を菌体表面に発現する組換え大腸菌の作製を試み、そのうちのいくつかについて組換え大腸菌を作製することが出来た。これらのあるものは宿主細胞特異的な付着侵入に関与するという示唆を得ている。

さらに、*R. conorii* は貪食細胞以外の動物

細胞に rOmpB をリガンドとして Ku70 を介して付着侵入するが、Ku70-rOmpB 相互作用の侵入過程における役割はほとんど不明であった。今回、大腸菌の種々の発現系を用いてこれを解析した。

rOmpB パッセンジャードメインの組換えペプチドは哺乳動物細胞の Ku70 と相互作用し、付着を拮抗阻害した。また、Ku70 の発現を Ku70 の si-RNA で抑制したところ、侵入の阻害がみられた（図 2）。

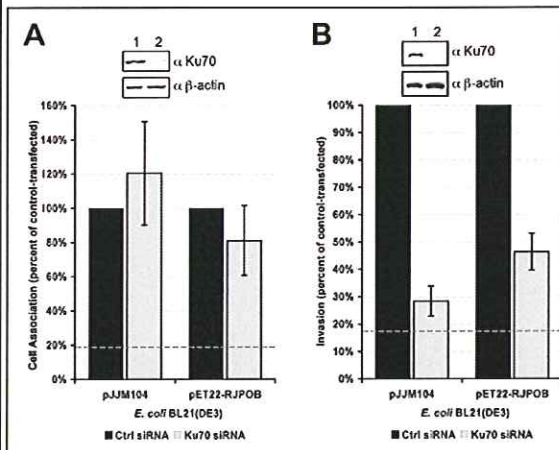


図 2: 哺乳動物細胞への rOmpB を介する Ku70 依存的侵入

rOmpB 依存的付着 (A)、あるいは侵入 (B) への Ku70 si-RNA の効果。

HeLa 細胞に対照 (黒) あるいは Ku70 (灰) si-RNA をトランスフェクトし、エンブティベクターあるいは全長の rOmpB (pJJM104 又は pET22-RJPOB) を発現する大腸菌 BL21 (DE3) を接種し、付着 (A) あるいは侵入 (B) を定量した。濃灰色の破線はエンブティベクターを発現する大腸菌の非特異的付着のレベルを示す (対照の si-RNA をトランスフェクトした細胞への rOmpB を介する付着 [A] あるいは侵入 [B] を 100% とする)。

挿入図: (1) 対照、あるいは (2) Ku70 si-RNA をトランスフェクトした HeLa 細胞における Ku70 蛋白質量の免疫プロット法による解析。蛋白質量の対照として抗  $\beta$  アクチンを用いた。

また、リケッチアの宿主細胞への rOmpB が存在する感染により、付着部位にチロシンリン酸化蛋白質とホスホイノシチド3-キナーゼ依存的活性および微小管などの働きでアクチン重合が起こり、これによりリケッチアが細胞内に取り込まれることが明らかになった。さらに、rOmpB と Ku との相互作用を介する侵入は、c-Cbl、クラスリン、カベオリン-2 の si-RNA により阻害された (図 3)。

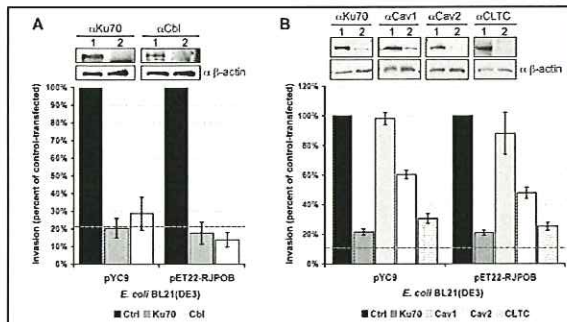


図 3 : c-Cbl、クラスリン、カベオリン-2 に依存した rOmpB を介する哺乳動物細胞への侵入

A. c-Cbl siRNA の侵入への効果。対照 (黒)、Ku70 (灰) あるいは c-Cbl (白) の si-RNA をトランスフェクトした HeLa 細胞にエンティベクター (pET-22b) あるいは rOmpB (pYC9 又は pET22-RJPOB) を持つ大腸菌 BL21(DE3) を感染し、ゲンタマイシン保護定量法によりその侵入量を定量した。対照の si-RNA をトランスフェクトした細胞への rOmpB 依存性侵入を 100% とする。濃灰色の破線は、エンティベクターを発現する大腸菌で見られる非特異的侵入のレベルを示す。挿入図: (1) 対照、あるいは (2) 遺伝子特異的 siRNA をトランスフェクトした細胞における Ku70 (上左) あるいは c-Cbl (上右) の蛋白質の免疫ブロット法による解析。  
B. カベオリン-1、カベオリン-2、およびクラスリン重鎖の siRNA が rOmpB 依存性侵入に及ぼす効果。対照 (黒)、Ku70 (濃灰)、カベオリン-1 (Cav1、淡灰)、カベオリン-2 (Cav2、白)、あるいはクラスリン重鎖 (CLTC、格子) の si-RNA をトランスフェクトした HeLa 細胞にエンティベクターあるいは rOmpB (pYC9

又は pET22-RJPOB) を持つ大腸菌 BL21 (DE3) を接種し、ゲンタマイシン保護定量法により細菌の侵入量を調べた。

挿入図: (1) 対照あるいは (2) 遺伝子特異的 siRNA をトランスフェクトした細胞における Ku70 (上 1)、Cav1 (上 2)、Cav2 (上 3)、CLTC (上 4) のタンパク量の免疫ブロット法による解析。抗  $\beta$  アクチン抗体を蛋白質量の対照として用いた。

以上の結果より、リケッチア感染の宿主特異性が細胞レベルで規定されていることが示された。また、その付着侵入にはリケッチア外膜蛋白質 rOmpB と宿主因子 Ku70 が関与しており、クラスリン、カベオリン依存的エンドサイトーシスによることが解明された。

## 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 3 件)

- ① Uchiyama, T., Ogawa, M., Kishi, M., Yamashita, T., Kishimoto, T., and Kurane, I. Restriction of the growth of typhus group rickettsiae in tick cells. *Clinical Microbiology and Infection*, DOI:10.1111/j.1469-0691.2008.02263.x. 査読有
- ② Ogawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Uchiyama, T., Hagiwara, K., Hanada, K., Kurane, I., and Kishimoto, T. Shotgun proteomics of *Orientia tsutsugamushi*. *Clinical Microbiology and Infection*, DOI:10.1111/j.1469-0691.2008.02157.x. 査読有
- ③ Chan, Y.G.Y., Cardwell, M.M., Hermanas, T.M., Uchiyama, T., and Martinez, J.J. 2009. Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cellular Microbiology* 11:629-644. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

- ① 内山恒夫、小川基彦 (2009 年 3 月 13 日、ポスター) マダニ細胞における発疹チフス群リケッチア増殖抑制へのオートファジーの関与. 第 82 回日本細菌学会総会、名古屋.
- ② 内山恒夫、小川基彦、岸 真帆美、山下知輝、岸本寿男、倉根一郎 (2008 年 11 月 1 日、口演) マダニ由来細胞における発疹チフス群リケッチアの増殖抑制機構. 第 26 回日本クラミジア研究会・第 15 回リケッチア研究会合同学術集会、岐阜.
- ③ 小川基彦、大内史子、内山恒夫、松谷峰之介、萩原健一、花田賢太郎、倉根一郎、岸本寿男 (2008 年 10 月 28 日、口演) *Oreintia tsutsugamushi* 発現蛋白質の網羅的同定. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山.
- ④ 内山恒夫、小川基彦、岸 真帆美、山下知輝、岸本寿男、倉根一郎 (2008 年 10 月 28 日、口演) 発疹チフス群リケッチアのマダニ由来細胞における増殖抑制機序の形態学的解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山.
- ⑤ Ogawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Uchiyama, T., Hagiwara, K., Hanada, K., Kurane, I. and Kishimoto, T. (May 19, 2008, oral presentation) Shotgun proteomics of *Orientia tsutsugamushi*. 5th International conference on rickettsiae and rickettsial diseases. May, 2008. Marseille, France.
- ⑥ Uchiyama, T., Ogawa, M., Kishi, M., Yamashita, T., Kishimoto, T., and Kurane, I. (May 19, 2008, poster presentation) Restriction of the growth of typhus group rickettsiae in tick cells. 5th International conference on rickettsiae and rickettsial diseases. Marseille, France.
- ⑦ 内山恒夫、小川基彦 (2008 年 3 月 26 日、口演、25 日、ポスター) リケッチアの感染性保存に及ぼす糖の効果. 第 81 回日本細菌学会総会、京都.
- ⑧ 内山恒夫、小川基彦、岸真帆美、岸本寿男、倉根一郎、足立昭夫 (2007 年 10 月

27 日、口演) リケッチア感染の宿主特異性. 第 25 回日本クラミジア研究会・第 14 回リケッチア研究会合同研究発表会、東京.

- ⑨ 内山恒夫、小川基彦、鎌田和弥、八町和樹、倉根一郎、足立昭夫 (2007 年 10 月 22 日、ポスター) リケッチア種間のミトコンドリアプロセッシングペプチダーゼ相同遺伝子の比較解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌.

〔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.

## 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

なし

### (3) 連携研究者

なし