

ウレアプラズマによる宿主細胞死の回避

～気配を消す流早産原因菌の戦略～

大阪母子医療センター研究所・免疫部門

西海史子（流動研究員）、柳原格（部長）

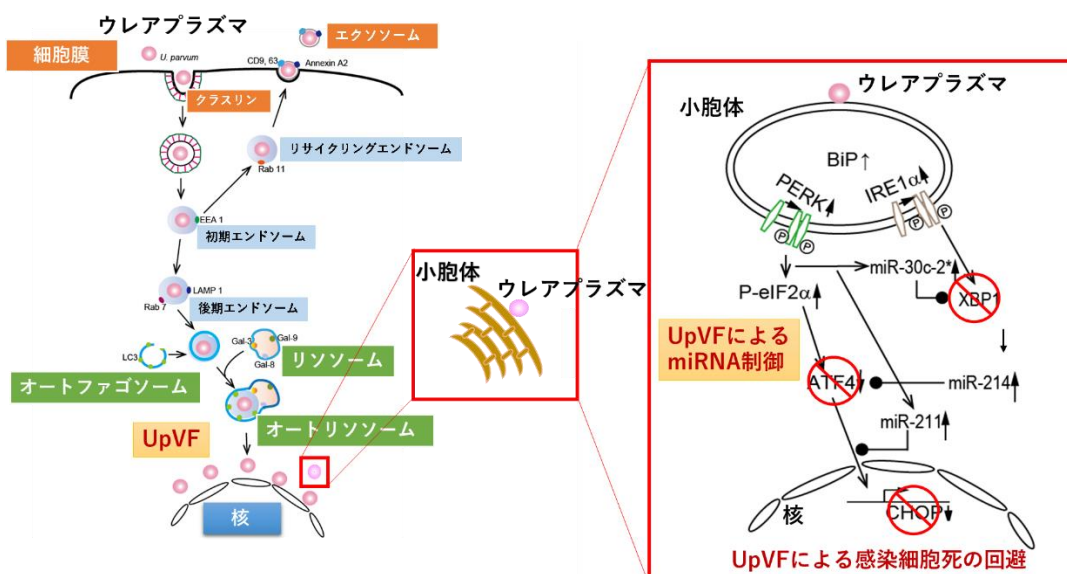
研究成果のポイントと解説

- 主な流早産の原因であるウレアプラズマは、感染したヒト細胞内に侵入し、細胞内で栄養を得て生存している。今回発見したウレアプラズマ空胞化因子（UpVF）は、宿主細胞のマイクロRNA（用語説明）を調節することで小胞体ストレス（用語説明）を遮断し、感染細胞死も逃れていた。このことによってウレアプラズマは宿主のストレス（感染）感知機構をすり抜け、感染した細胞を殺すことなく宿主細胞から栄養の供給を受けることが出来る。
※胎児への持続的な感染や炎症は、胎児の肺や神経系組織を障害するため、UpVF は、胎児や母体にとっては重症化に関わる病変因子と言える。
- これまでウレアプラズマには遺伝子改変技術がなく、ウレアプラズマの病原性の解析は困難であった。研究グループでは、ミニマルセル（用語説明）のゲノムにウレアプラズマ遺伝子を組み込むことに成功し、UpVF の病原性を明らかにすることができた。
※合成生物学という新しい分野の技術で作られたミニマルセルは、最小ゲノムを持つ人工ゲノム生物（ウレアプラズマに近いマイコプラズマの一種を模した）である。生命の起源や、増殖・複製などのあらゆる生命現象、病原性の解明に向けてその応用研究が世界で始まっている。

研究成果の意義及び考察

UpVF の機能を抑制することで、ヒト細胞がウレアプラズマの細胞内感染を早期に感知ができれば、小胞体ストレスを通じて本来ヒトに備わっている病原体排除機構を作動させることが可能となる。このことから UpVF は新規治療の標的となりえる。世界で初めてウレアプラズマ遺伝子をミニマルセルに導入し機能解析に成功した。我が国におけるミニマルセルを用いた初めての報告であり「日本の合成生物学の幕開け」となった。

UpVF による宿主細胞死回避機構



(研究組織)

大阪母子医療センター・研・免疫部門 (大阪母子医療センター研究所)

J. Craig Venter Institute (ベンター研究所)

国立研究開発法人産業技術総合研究所 (産総研)

近畿大学医学部救急医学講座 (近大医)

柳原格部長 (責任著者)

Jhon I. Glass 教授

柿澤茂行主任研究員

濱口満英講師

(発表論文)

Blockade of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by *Ureaplasma parvum* vacuolating factor.

(掲載雑誌) Cellular Microbiology 2021:e13392.10月11日 (午後2時)

(著者) Fumiko Nishiumi, Yasuhiro Kawai, Yukiko Nakura, Michinobu Yoshimura, Heng Ning Wu, Mitsuhide Hamaguchi, Shigeyuki Kakizawa, Yo Suzuki, John I. Glass, and Itaru Yanagihara

<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/14625822>

(研究費)

AMED「新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業」(柳原早産研究班)

日本学術振興会科学研究費 (西海、吉村、柳原)

中谷医工計測技術振興財団「特別研究助成」(柳原)

米国 National Science Foundation MCB program (Glass)

研究背景

世界では、年間 1,500 万人の子供が早産で生まれ、その中で年間 100 万人が早産とその合併症で亡くなっている (WHO)。また 5 歳以下の子供の死亡原因の第 1 位は早産で生まれることである (unicef)。早産原因の 3 割～半数は膣からの細菌の上行感染であるとされている。我が国の早産 (妊娠 22 週～37 週未満) 率は 6%弱、年間 55,000 人が早産で生まれている。早産児の主な合併症には、新生児慢性肺疾患や、神経系の障害などがある。本邦の生後 1 か月 (4 週) 未満の新生児死亡、および 1 歳未満の乳児死亡原因の第 2 位は周産期に特異的な呼吸障害及び心血管障害である。我々は流早産の多くに認める胎盤の炎症 (絨毛膜羊膜炎) を解析し、マイコプラズマ科のウレアプラズマ細菌が高い頻度 (42%) で検出されることを明らかにした (Ped Res, 2010)。臨床的には、胎内での炎症の強さや、暴露期間が児の肺や神経系の予後を左右するとされる。また、早産を起こす母体の多くは、自覚症状 (発熱やおなかの張りなど) を訴えた際にはすでに胎内の炎症が進行していることがあり、早産の制御は今なお周産期医療最大の課題である。

ウレアプラズマは最小病原細菌の一つで、病院検査室の顕微鏡検査では観察できないため、特殊な培養や PCR 検査などで検出している。その名の示す通り、尿素 (ウレア) からエネルギー (ATP)を得ており、泌尿生殖器から分離される。胎児の尿が主体の羊水はウレアプラズマにとっては格好の増殖環境と言える。我々の検討で、ウレアプラズマはヒトの胎盤や胎児の細胞に侵入することで、母体の抗体などの免疫系をすり抜けている可能性が示された。また細胞内に侵入したウレアプラズマは細胞内で分解や、病原体の殺菌をつかさどる膜 (オートファジー) を抜け出し増殖したが、その機序は不明であった (MicrobiologyOpen, 2017)。

研究成果

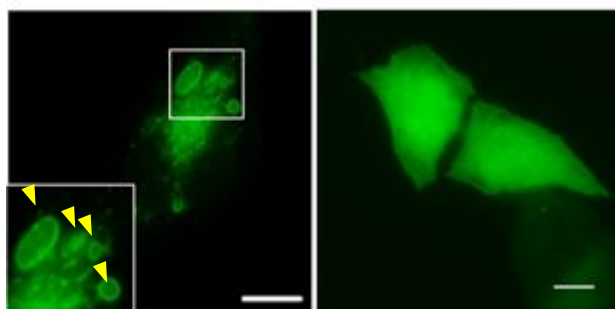
1. UpVF の発見と宿主細胞の小胞体ストレスへの影響

酵母を用いてウレアプラズマの機能の不明な遺伝子をスクリーニングした結果、酵母の生育を阻害する遺伝子を同定した。ヒト培養細胞にこの遺伝子を導入したところ、細胞の膜の異常を示す大小さまざまな「空胞」を形成した為、ウレアプラズマ空胞化因子 (UpVF) と名付けた (図 1 :黄色三角)。

図 1 ウレアプラズマ空胞化因子の細胞への導入

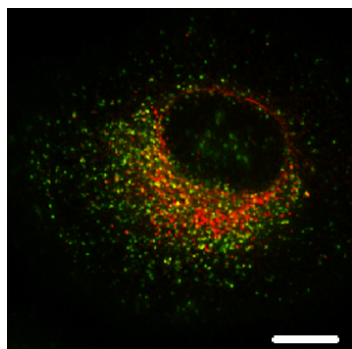
UpVF を発現させた細胞

対照 EGFP (用語説明参照)



ウレアプラズマと小胞体の関係について蛍光顕微鏡 (図 2 A) 及び電子顕微鏡 (図 2 B) で観察した

図 2 A ウレアプラズマはヒト細胞に感染後、細胞内の細胞内小器官 (小胞体) と共局在していた。



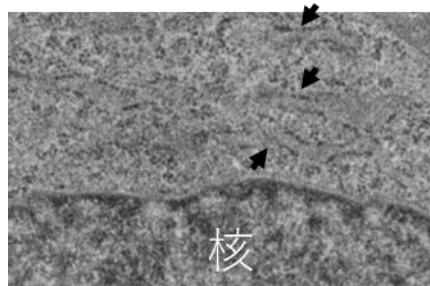
ウレアプラズマ (赤)

小胞体 (緑)

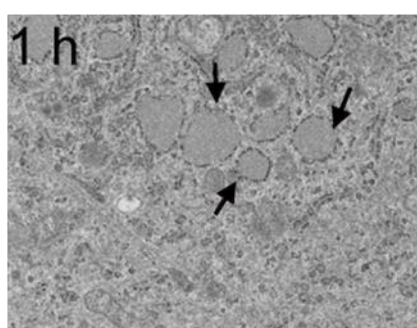
共局在 (黄色)

スケールバー10 マイクロメートル

図 2 B ウレアプラズマ感染 1 時間後の小胞体の変化 (電子顕微鏡)



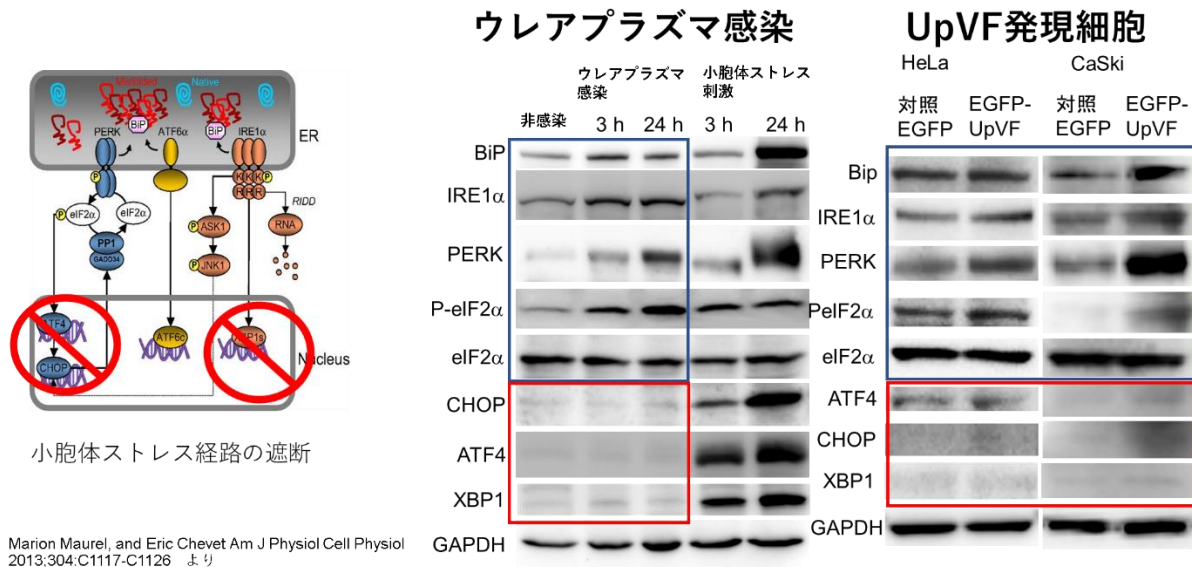
感染前の小胞体 (矢印)



感染 1 時間後の小胞体の膨化 (矢印)

ウレアプラズマ及び UpVF が小胞体ストレスに及ぼす影響について調べた。その結果、ウレアプラズマおよび UpVF は小胞体ストレスの ATF4, CHOP, XBP1 を遮断した（図 3）。

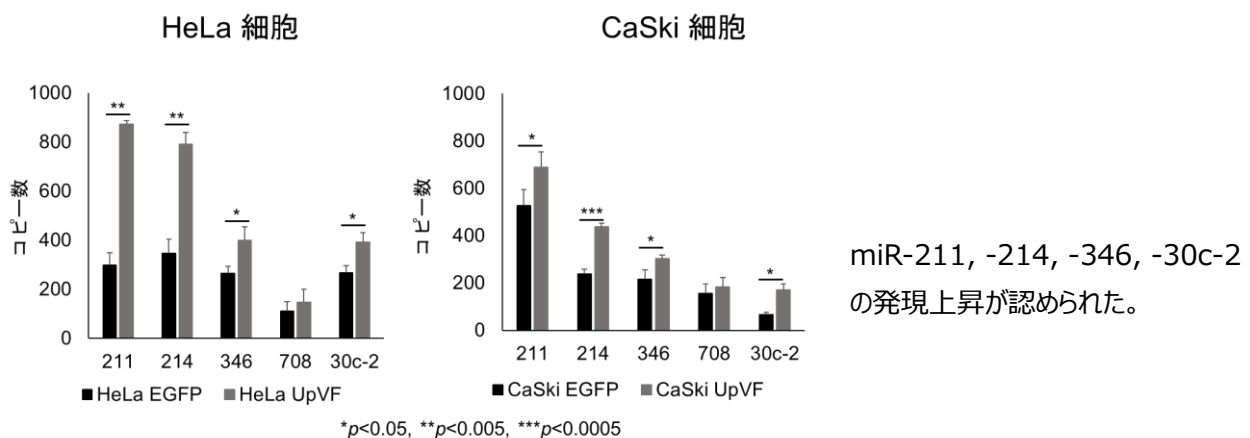
図 3 ウレアプラズマ感染細胞、UpVF 発現細胞と小胞体ストレスとの関係



ウレアプラズマを感染させた細胞と、UpVF を導入発現させた細胞は同様に小胞体ストレスのシグナルが遮断されていた

さらに ATF4, CHOP, XBP1 といった小胞体ストレスを遮断するメカニズムについて調べるため、ヒト細胞の全マイクロ RNA (miRNA) の変化を調べた結果、UpVF 発現細胞株では小胞体ストレスを遮断する miR-211, -214 の発現上昇を認めた（図 4）。これらの miRNA の阻害を行ったところ、アポトーシス（用語説明）が誘導されたことから、UpVF はこれらの miRNA を介して宿主の細胞死を制御していることが示された。

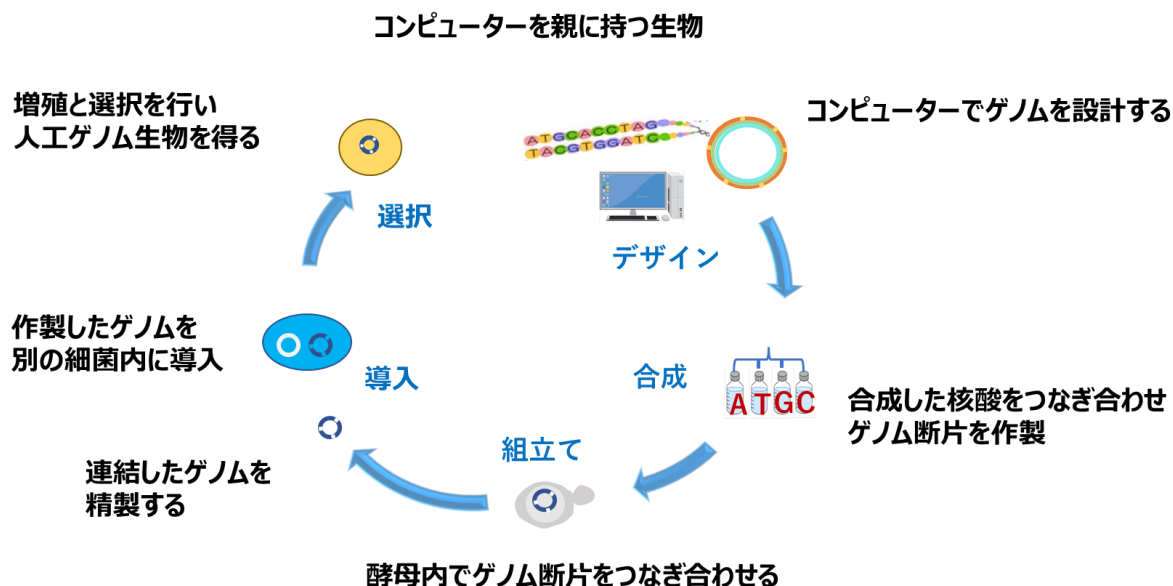
図 4 UpVF 発現による小胞体ストレス関連 miRNA の発現解析



2. ミニマルセルを用いた UpVF の機能解析

ウレアプラズマには遺伝子変異の導入や、遺伝子を欠損させるといった遺伝子改変システムが存在しないため、米国 J. Craig Venter Institute、国立研究開発法人産業技術総合研究所との共同研究にて、全合成したゲノムから構成された人工ゲノム細菌ミニマルセル（JCVI-syn3.0B：図 5）にウレアプラズマの遺伝子を組込む方法を開発した。この技術によって、ウレアプラズマの蛋白質を発現したミニマルセルが作製できるようになった。

図 5 合成生物学（Synthetic Biology）の手法（Hutchison III, Science 2016）より



Hutchison III, Science 2016を改変

ウレアプラズマの遺伝子を導入していないミニマルセル（JCVI-syn3.0B）は生きるための最小限の遺伝子しか持たない。そのため、ヒトの培養細胞には接着することができない。そこでウレアプラズマの外膜リポ蛋白質の MBA を発現させたミニマルセルを作製したところ、培養ヒト細胞に接着性が確認された（Syn-MBA：黄色矢頭）。さらに MBA と UpVF の両方を同時に発現させたミニマルセル（Syn-MBA-UpVF）を培養ヒト細胞に感染させたところ、感染 6 時間後には、感染細胞は非感染コントロールに比べて細胞表面全体が不正で膜の障害が起きていた（図 6 A）。Syn-MBA-UpVF 感染 6 時間後には生存している細胞数が一時的に減少したものの、その後細胞数は増えた（図 6 B）。Syn-MBA-UpVF 感染細胞では、細胞死の経路が抑制されたことで細胞数が増えたものと考えられた。ミニマルセルを用いたウレアプラズマの遺伝子の発現に成功するとともに、感染細胞の影響解析も可能となった。

図 6 A ミニマルセルにウレアプラズマ遺伝子を発現させ、HeLa 細胞に感染させた（電子顕微鏡像）

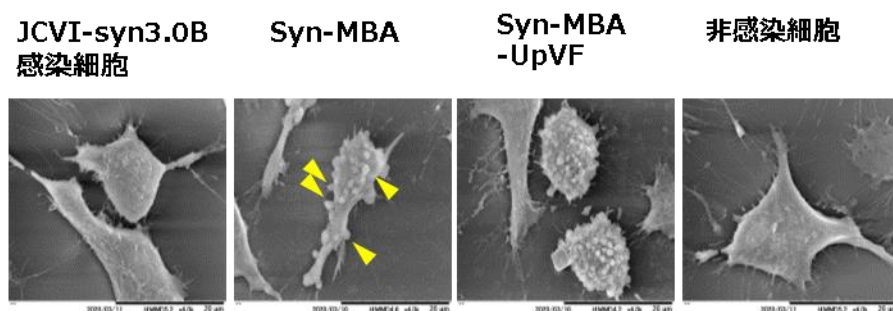
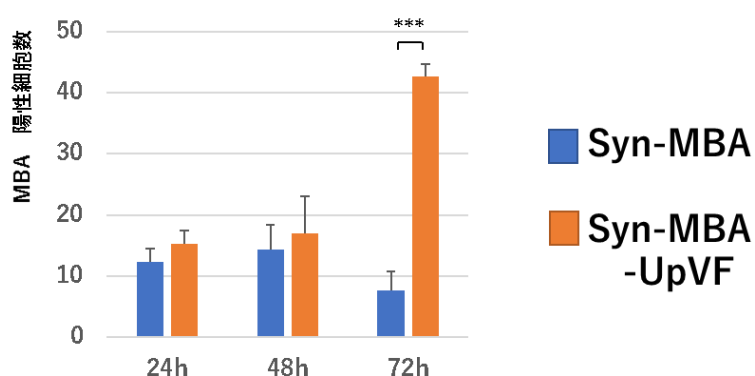


図 6 B Syn-MBA-UpVF 感染後の細胞数（単位時間）



用語説明

マイクロ RNA (miRNA)

21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与する。

小胞体ストレス

我々の細胞は病原細菌に感染し、ひどく損傷を受けると細胞死が誘導される。しかし、個々の細胞には、損傷を乗り越え、細菌を排除するための自律防御機構も存在する。これらの反応の多くは、細胞の恒常性（ホメオスタシス）の異常を検知することで引き起こされる。一連の反応では、タンパク質翻訳やミトコンドリア呼吸などの必須細胞機能を低下させ、特異的な自然免疫反応を誘発することで病原体に抵抗する。これらの自律防御機構の発動は、小胞体などの細胞内小器官が検知し、順次応答する。非感染時にも、小胞体のホメオスタシスが乱れると、アンフォールド（機能的な構造に折り畳まれていない）タンパク質が蓄積し、それが小胞体ストレスセンサーに検出され小胞体ストレス応答（UPR）が起こり、やがて細胞は正常な状態に戻されていく。一方で、処理しきれない小胞体ストレス応答が起こると細胞死（アポトーシス）が引き起こされる。

ミニマルセル

米国ベンター研究所において作成された細菌のこと。ミニマルセルである JCVI-syn3.0 菌株は、ウレアプラズマに近縁なマイコプラズマの一種 (*Mycoplasma mycoides* subsp. *capricolum*) をベースに作成され、生命の維持に欠かせない最少の 473 遺伝子のみを持つため、増殖以外の機能を持たないと考えられる。その作成方法は、最少のゲノムを人工的に設計・合成し、合成した DNA 断片を酵母の中でつなぎ合わせ、それをマイコプラズマ科の細菌の中に導入し、選択を行う方法であり、これにより人工ゲノム生物（細菌）を作り上げることに成功した。本研究に用いた菌株は JCVI-syn3.0B であり、これは JCVI-syn3.0 に十数個の遺伝子が追加で導入された菌株であり、細胞の形態が均一になっている。なお人工のゲノムや遺伝子断片を用いて生命現象を紐解く研究は「合成生物学（synthetic biology）」と呼ばれる。

EGFP

緑色蛍光タンパク質はオワンクラゲの緑色の蛍光性をもつタンパク質。

アポトーシス

多細胞生物の体を構成する細胞死の一種で、発生段階や、個体をより良い状態に保つためなどの際に積極的に引き起こされるプログラムされた細胞死のことをいう。

本件に関する問い合わせ先

報道に関すること

地方独立行政法人大阪府立病院機構
大阪母子医療センター
事務局 総務人事グループ 中野 嘉子（なかの よしこ）
TEL：0725-56-1220(内 3272)
e-mail: nakanoyos@opho.jp

研究に関すること

地方独立行政法人大阪府立病院機構
大阪母子医療センター
研究所免疫部門・部長 柳原 格（やなぎはら いたる）
e-mail: itaruy@wch.opho.jp