

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2017

課題番号：15H06649

研究課題名(和文) 異常な形態へ変化したクラミジアの特徴解析による新規治療薬の標的分子探索

研究課題名(英文) Search for target molecules for a novel therapeutic agent of Chlamydia trachomatis by the analysis of characteristics of the bacterium changed into aberrant bodies.

研究代表者

黒木 香澄(石田香澄)(Ishida-Kuroki, Kasumi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：80760272

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文): クラミジア慢性感染症の原因の一つとして aberrant body (AB) への移行が考えられる。本菌はペニシリンや IFN- $\gamma$  の曝露等により AB へ変化するが、これについては不明な点が多い。本研究では、ペニシリン誘導性 AB 感染細胞は通常のクラミジア感染細胞に比べてリソソームマーカーの発現が高いことや、IFN- $\gamma$  誘導性 AB や通常のクラミジアよりペニシリン誘導性 AB の方が細胞内生存性が低い傾向にあることを明らかにした。また、クラミジア III 型分泌装置のエフェクター蛋白質と推定される CT228、CT232、CT365、CT849 はペニシリンによって AB に変化すると発現が低下または上昇することがわかった。

研究成果の概要(英文): One of causes for the chronic infection of Chlamydia trachomatis is the morphological change to aberrant body (AB). It is known that chlamydia could change into AB by various stresses such as the exposure to penicillin or IFN- $\gamma$ , but the detail characteristics of AB is unclear. In this study, we showed that the expression of lysosomal marker was increased in penicillin-induced AB infected cells compared with normal chlamydia or IFN- $\gamma$ -induced AB infected cells. In addition, penicillin-induced AB tended to show low viability compared with normal chlamydia or IFN- $\gamma$ -induced AB. Furthermore, the expression of CT228, CT232, CT365 and CT849 which were predicted as chlamydial effector proteins of type III secretion system changed in penicillin-induced AB. These results suggested that CT228, CT232, CT365 and/or CT849 play some roles in the lysosomal fusion with chlamydial vacuoles and changes of the expression of these protein affected the viability of penicillin-induced AB.

研究分野：細菌学

キーワード：クラミジア 慢性感染 aberrant body リソソーム融合 エフェクター蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) クラミジアはヒトに感染する病原性細菌であるが、クラミジア感染症は劇症化しづらく無症候例も多いため、無自覚のうちに感染が慢性化していることも少なくない。本菌は宿主細胞の中でしか生存・増殖することができない偏性細胞内寄生性細菌であり、ヒトに適応するように進化してきた。そのため、宿主の強い免疫応答を惹起せず、激しい炎症反応を誘導しにくいと考えられる。またクラミジアは IFN- $\gamma$  やペニシリンの曝露など様々なストレスによって異常な形態 (aberrant body、以下 AB) へ変化する。AB は感染能や増殖能を欠いているのが特徴だが、ストレスが除かれると再び活発に増殖するようになる。さらに AB は通常のクラミジア菌体に比べて抗菌剤が効きにくいことも報告されている。このようにクラミジアは AB としてヒト体内に存在しつづけることができる可能性があり、AB がクラミジア感染症の慢性化に関係することは十分に考えられる。しかしながら、宿主が AB に対してどのように応答するのかについてはわかっていない。

(2) クラミジアは菌体表面に存在する III 型分泌装置 (type 3 secretion system、以下 T3SS) を介して宿主細胞にエフェクター蛋白質を注入し、自らの増殖に都合が良いように宿主細胞を修飾する。通常、細胞内に取り込まれた異物はリソソームとの融合・分解などにより排除されるが、クラミジアは Inc と呼ばれるエフェクター蛋白質を封入体に注入することで、リソソームとの融合を防ぐと考えられている。しかし AB へ変化したクラミジアが T3SS やエフェクター蛋白質を発現することはわかっているものの、それらが機能するかどうかについてはわかっていない。さらに AB がリソソームによって分解されるのか、通常のクラミジアと同様にリソソーム融合を阻止できるのかについても明らかでない。

## 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえて本研究では以下の 2 点を明らかにすることを目的とした。これらの解明は AB の生物学的特徴や AB に対する免疫応答の理解につながるものであり、クラミジアの新規治療薬開発のための標的分子探索に重要であると考えた。

(1) AB へ移行したクラミジアがリソソーム融合などの自然免疫により排除されるのかを明らかにする。

(2) AB はクラミジアの病原性発揮や細胞内生存に必要なエフェクター蛋白質を分泌するのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) AB への移行条件の検討

クラミジアは IFN- $\gamma$  やペニシリンの曝露、栄養分枯渇により AB へと移行する。本研究では移行条件の違いにより AB の表現形や宿主細胞内の局在が異なるかどうかについても検討するため、複数の方法で AB への移行を誘導した。また、クラミジアは本菌慢性感染による不妊症等が問題視されている *Chlamydia trachomatis* を使用した。具体的には感染 24 時間前に IFN- $\gamma$  またはペニシリンを培養液に添加し、*C. trachomatis* をヒト株化上皮細胞 HeLa に吸着感染後 (800 $\times$ g、1 時間、室温)、37 $^{\circ}$ C $\cdot$ 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 0~7 日間培養した。IFN- $\gamma$  またはペニシリンの濃度はこれまでの報告を参考に至適濃度を検討し、クラミジア表現形や生存性の違いを抗クラミジア LPS 抗体による蛍光免疫染色と inclusion forming unit assay (以下 IFU 法)、reverse transcription-PCR 法 (以下 RT-PCR 法) で確認した。

### (2) エンドソームマーカーおよびリソソームマーカーの発現解析

クラミジア感染細胞におけるエンドソームマーカー Rab5 および Rab9、リソソームマーカー LAMP1 の遺伝子発現を RT-PCR 法で確認した。

### (3) AB の細胞内局在解析

(1) の実験で確立した方法により、クラミジアの AB への移行を誘導し、通常のクラミジアと AB の細胞内局在を比較した。具体的には AB へ移行したクラミジアおよび通常のクラミジア封入体膜に局在するエンドソームマーカーやリソソームマーカーをそれぞれの抗体を用いた蛍光免疫染色で確認した。

### (4) 膜移行が予測される T3SS エフェクター蛋白質の選出

細菌の分泌蛋白質の予測システム EffectiveT3

(<http://effectivedb.org/effective/submit>) と膜蛋白質予測システム SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>) を使用して、膜への移行が予測される *C. trachomatis* の T3SS エフェクター蛋白質を選出した。

(5) AB へ移行したクラミジアにおける膜移行が予測される T3SS エフェクター蛋白質の発現確認: (1) で確立した方法により、AB へ移行したクラミジアの感染細胞から RNA を抽出し RT-PCR 法で (3) で選出した膜に移行するエフェクター蛋白質と推定される 35 個のクラミジア蛋白質の遺伝子発現を確認した。

#### 4. 研究成果

(1) クラミジアの AB への移行条件の確立  
5~50 ng/mL の IFN- $\gamma$  または 0.1~100 U/mL のペニシリンで前処理した HeLa 細胞に *C. trachomatis* を感染し 24-48 時間培養したところ、いずれの AB 誘導剤においても濃度依存的に IFU 値が低下することがわかった。また、蛍光免疫染色でクラミジア菌体と封入体を観察すると、IFN- $\gamma$  またはペニシリン処理細胞では未処理細胞に比べて、封入体が小さく、封入体内のクラミジア菌数が少なかった。これはつまり AB 誘導剤濃度依存的に感染能を有するクラミジア菌体が減少し、AB へ移行したと理解した。さらに、これらの AB 誘導剤の細胞毒性を調べたところ、ペニシリンは 100 U/ml まで HeLa 細胞の生存性に影響しなかったが、5 ng/ml の IFN- $\gamma$  では添加後 4 日目、10 ng/ml の IFN- $\gamma$  では添加後 3 日目から細胞生存率の低下が認められた。これらの成績から、本研究ではクラミジアの AB への移行誘導には IFN- $\gamma$  5 ng/ml またはペニシリン 100 U/ml を使用することにした。

#### (2) AB に移行したクラミジアの生存性と AB 感染細胞におけるエンドソームマーカーおよびリソソームマーカーの発現量

RT-PCR 法により、クラミジア 16S rRNA 遺伝子の発現量を確認したところ、通常のクラミジアおよび IFN- $\gamma$  誘導性 AB は感染 96 時間後まで遺伝子発現量が増加していたのに対し、ペニシリン誘導性 AB は遺伝子発現の増加は認められなかった。つまり、通常のクラミジアおよび IFN- $\gamma$  誘導性 AB に比べてペニシリン誘導性 AB は細胞内生存性が低いことが示唆された。次に、クラミジア感染細胞におけるエンドソームマーカー Rab5 および Rab9、リソソームマーカー LAMP1 の遺伝子発現を RT-PCR 法で確認したところ、通常のクラミジア感染細胞よりも IFN- $\gamma$  およびペニシリン誘導性 AB 感染細胞で lamp1 遺伝子の発現量が高い傾向にあった。

#### (3) AB の細胞内局在

IFN- $\gamma$  またはペニシリン処理細胞を比較すると、IFN- $\gamma$  処理細胞内の封入体の方が小さく、誘導剤の違いにより AB の性質が異なることが示唆された。また、リソソームマーカー LAMP1 とクラミジアに対する抗体を使用し蛍光免疫染色法で両者の細胞内局在の解析を試みたところ、LAMP1 が AB を含む封入体に局在する像は認められなかった。しかし、通常のクラミジアや IFN- $\gamma$  誘導性 AB 感染細胞よりもペニシリン誘導性 AB 感染細胞で LAMP1 の発現が高い傾向が認められた。

#### (4) AB へ移行したクラミジアにおける膜移行が予測される T3SS エフェクター蛋白質の遺伝子発現比較

ソフトウェア EffectiveT3 と SOSUI を用いて

膜へ移行すると推定されるクラミジア T3SS エフェクター蛋白質の候補を 35 個に絞り込み、それらの遺伝子発現量を RT-PCR で解析した。その結果 CT228、CT232、CT365、CT849 は通常のクラミジアや IFN- $\gamma$  誘導性 AB よりペニシリン誘導性 AB で発現が低下または上昇する傾向にあることがわかった。

以上(1)~(4)の成績から、CT228、CT232、CT365、CT849 がクラミジアのリソソーム消化防御において何らかの役割を果たしており、ペニシリン誘導性 AB ではこれらの T3SS エフェクター蛋白質の発現が変化するために、通常のクラミジアや IFN- $\gamma$  誘導性 AB に比べて細胞内生存性が低下する可能性が考えられた。また、研究開始当初は AB の T3SS が機能し、エフェクター蛋白質を分泌するかどうかについて明らかにすることも研究目的としていたが、研究期間内にこれを明らかにすることはできなかった。しかし、本研究で AB に移行したクラミジアがリソソーム融合により細胞内から排除される可能性を明らかにし、さらにそれに関わる蛋白質の候補として CT228、CT232、CT365、CT849 を挙げる事ができた。本研究のように AB 誘導剤の違いによる AB の性質の違いから、クラミジアに対する宿主の免疫応答の違いを明らかにしようとした研究はこれまでにない。本研究でクラミジアのリソソーム融合阻止に関わる事が示唆された 4 つの蛋白質の機能を詳細に明らかにすることで、クラミジアの細胞内生存メカニズムやクラミジアに対する宿主の免疫応答の解明につながる事が期待される。

#### 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 Yamada R, Tien le HT, Arai S, Tohya M, Ishida-Kuroki K, Nomoto R, Kim H, Suzuki E, Osawa R, Watanabe T, Sekizaki T. Development of PCR for identifying *Streptococcus parasuis*, a close relative of *Streptococcus suis*. J. Vet. Med. Sci., 2018. in press. (査読有)
- ② Arai S, Kim H, Watanabe T, Tohya M, Suzuki E, Ishida-Kuroki K, Maruyama F, Murase K, Nakagawa I, Sekizaki T. Pig saliva as a *Streptococcus suis* reservoir and potential source of infection on farms: Implications from a novel quantitative PCR. Am. J. Vet. Res., 2018. in press. (査読有)
- ③ Tohya M, Arai S, Tomida J, Watanabe T, Kawamura Y, Katsumi M, Ushimizu M, Ishida-Kuroki K, Yoshizumi M, Uzawa Y,

Iguchi S, Yoshida A, Kikuchi K, Sekizaki T. Defining the taxonomic status of *Streptococcus suis* serotype 33: the proposal for *Streptococcus ruminantium* sp. Nov., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2017;67:3660-3665.  
doi: 10.1099/ijsem.0.002204. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① Kuroki K, Nozawa T, Watanabe T, Kim H, Suzuki E, Nakagawa I, Sekizaki T. Induction of cytotoxicity and autophagy of *Streptococcus suis* in human or porcine cells. 第91回日本細菌学会総会. 2018年3月27-29日. 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
- ② Suzuki E, Watanabe T, Kuroki K, Sekizaki T. Visualizing capsule positive and negative *Streptococcus suis* in infective endocarditis. 第91回日本細菌学会総会. 2018年3月27-29日. 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
- ③ Takeshita N, Watanabe T, Kim H, Kuroki K, Sekizaki T. Longitudinal study of *Campylobacter* colonization and chicken intestinal microbiota in broiler farms. 第91回日本細菌学会総会. 2018年3月27-29日. 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
- ④ Kim H, Arai S, Murase K, Watanabe T, Kuroki K, Maruyama F, Tohya M, Suzuki E, Takeshita N, Nakagawa I, Osawa R, Sekizaki T. Investigation of microbiota in pig farms for understanding the route of *Streptococcus suis* infection. 第91回日本細菌学会総会. 2018年3月27-29日. 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
- ⑤ Ishida K, Takahashi H. The approach for the determination of chlamydial proteins inhibiting the lysosomal fusion. 第89回日本細菌学会総会. 2016年3月23-25日. 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒木 香澄 (KUROKI, Kasumi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・

特任助教

研究者番号：80760272