

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16660

研究課題名（和文）肺炎クラミジア遺伝子機能解析の為に遺伝子破壊株ライブラリの作製

研究課題名（英文）Generation of gene-knockout library in Chlamydia pneumoniae

研究代表者

清水 章文（Shimizu, Akinori）

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：40780135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまで作製報告のなかった肺炎クラミジアの遺伝子破壊株について、そのライブラリ構築を目的として研究を行った。作製されたプラスミドDNAの配列は目的としたものであったが、そのプラスミドDNAは遺伝子改変ベクターとして機能しなかった。その原因を解消するために保存していたDNAと大腸菌サブクローンをそれぞれ調べたところ、精製後少し時間を置いたプラスミドDNAはRFLP法による配列パターンがいずれも変化していた。これらのことから、様々なDNAを挿入し多くのサブクローン作製を試みるライブラリ作製という目的において今回用いた方法による肺炎クラミジア遺伝子改変は馴染まないのではと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究結果として、グループIIイントロンを利用した遺伝子改変プラスミドベクターの構築は問題なく達成できた。しかしながら、少なくとも今回設計したグループIIイントロンのプラスミドベクターは短期間しか保存することができなかった。

研究成果の概要（英文）：I tried to establishing a gene manipulated-Chlamydia pneumoniae library previously unreported. I carried out to construct the plasmid DNA vector which I designed at first. The DNA sequences were confirmed and same as designed sequences, however the transformant clones of C. pneumoniae were not obtained. To solve this problem, previous DNA samples were check by RFLP patterns. Then, the RFLP patterns were different from re-purified plasmid DNA that were same subclones before more than a month. The reason why the RFLP patterns were changed was not uncoverd. This result shown that difficulty of establishing a gene manipulated-C. pneumoniae library by the method that I tried.

研究分野：細胞生物学

キーワード：肺炎クラミジア グループIIイントロン 遺伝子改変 プラスミドベクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クラミジアは偏性細胞内寄生性のグラム陰性細菌である。肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae*) は集団の 10%程度が曝露を経験する細菌であり、市中肺炎の内非定型肺炎の起因細菌である (Elwell C, *Nat Rev Microbiol*, 2016)。また、肺炎クラミジアは免疫担当細胞へと感染・慢性化することにより動脈硬化を引き起こすとの報告がある (Cao F, *Infect Immun*, 2007)。これらを含め、クラミジア感染症は抗生物質投与により治療可能な細菌であるが、発展途上国におけるクラミジア感染の治療は費用対効果が小さく、また、効果的なクラミジアワクチンはこれまで開発されていない。また、抗生物質投与でも 3%程が治療失敗に終わるとされており (Regan DG, *Sex Transm Dis*, 2013)、抗生物質耐性株への懸念からも現在の治療法が十分であるとは言えないのが実情である。

所属研究室では、肺炎クラミジア血清型 AR-39 は他のクラミジアとは異なり、宿主細胞としてマクロファージ細胞内へと感染した際に NLRP3 インフラマソームを活性化することにより肺炎クラミジア自身の増殖に利用していることを見出した (Itoh R, *Biochem Biophys Res Commun*, 2014)。NLRP3 インフラマソームは細胞内免疫応答の一つである。免疫担当細胞が細菌やウイルスの構成成分 (病原体関連分子パターン) や細胞内にのみ存在している成分 (傷害関連分子パターン) を検知すると NLRP3 インフラマソームを活性化させることにより細胞外へと炎症性サイトカインである IL-1b や IL-18 を産生する (Conforti-Andreoni C, *Cell Mol Immunol*, 2011)。この感染細菌・ウイルスを排除するための自然免疫応答である NLRP3 インフラマソームを肺炎クラミジアがなぜ、どのような分子機構により自身の増殖に利用しているのかについては明らかにされていない。

そこで本研究では肺炎クラミジアの遺伝子破壊株を樹立し表現型解析をすることにより、肺炎クラミジアがどのような感染分子機構により免疫担当細胞への感染を果たすのか、肺炎クラミジアがどのような感染分子機構により感染宿主細胞のシグナル応答や代謝応答を変化させるのか、肺炎クラミジアが惹起した宿主細胞の NLRP3 インフラマソームからどのように回避するのか、肺炎クラミジアがどのようにそれらのシグナル応答や代謝応答の変化を自身の増殖に利用しているのか、というこれらの問いについて明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

感染性細菌の感染分子機構を明らかにするためにはその細菌の特定の遺伝子を破壊することにより細菌の感染増殖に対してどのような変化が生じるかを観察する逆遺伝学的手法を用いることが単純であり明快な方法である。しかしながら、これまでクラミジアにおける遺伝子発現ベクターの導入は報告があったが (Tam JE, *Can J Microbiol*, 1994)、クラミジアにおける逆遺伝学的解析手法は確立されておらず、遺伝子破壊株の作製は報告がなかった。しかし近年、逆遺伝学的解析手法として、シャトルベクターを利用した方法 (Wang Y, *PLoS Pathog*, 2011)、蛍光標識対立遺伝子置換法 (FRAEM 法; Mueller K, *mBio*, 2016)、グループ II イントロンを利用した方法 (Johnson C, *PLoS ONE*, 2013; Weber M, *J. Bacteriol.*, 2016) などがトラコーマクラミジアにおいて報告されている。しかし、肺炎クラミジアにおいてはこれまでに遺伝子破壊の成功例報告がなかった。そこで本研究では未確立である肺炎クラミジアの逆遺伝学的解析手法を築き、肺炎クラミジア遺伝子破壊株のライブラリを作製する。

所属研究室ではこれまでトラコーマクラミジア、クラミジア・ムリダルム (*Chlamydia trachomatis* Mouse pneumonitis; *Chlamydia muridarum*) との比較による肺炎クラミジアの感染分子機構の追究を試みてきた。その中で、*in vivo* における肺炎クラミジア感染により、脂肪組織 肝臓における脂肪酸代謝のバランスが大きく変化していることを見出している (現在投稿中)。この他にも、この代謝バランスの大きな変化と付随して観察される小胞体ストレス応答やミトコンドリアにおける代謝・動態の変化に関してのデータの蓄積がある。その為、それら蓄積されたデータと樹立した肺炎クラミジア遺伝子破壊株との比較による総合的な評価することが可能となる。

3. 研究の方法

本研究では肺炎クラミジアにおける遺伝子破壊株の作製及び各遺伝子破壊株の表現型解析を実施する。トラコーマクラミジアにおいてはプラスミド DNA を用いたアレリ置換法 (Mueller K, *mBio*, 2016) と II 型イントロンによる逆スプライシング反応を利用した遺伝子破壊法 (Johnson C, *PLoS ONE*, 2013) の二つが報告されているが、アレリ置換による遺伝子破壊はプラスミドベクター作製手順の多さとアレリ置換効率の低さから遺伝子破壊株ライブラリ作製には不向きであると考え、プラスミドが一過性でも発現すれば遺伝子破壊が成立する II 型イントロン発現ベクターを利用した方法を用いる。(図 1) この方法により樹立した肺炎クラミジア遺伝子破壊株ライブラリを利用し、以下の評価を実施する。

肺炎クラミジア野生株と比較してマクロファージ様株化細胞への感染増殖能が低下する肺炎クラミジア遺伝子破壊株の探索

感染時に宿主細胞の NLRP3 インフラマソーム活性化・小胞体ストレス・ゴルジ体の断片化を誘導しない肺炎クラミジア遺伝子破壊株の探索
 インフラマソームの活性の中心となるカスパーゼ-1の阻害剤 YVAD を処理することにより本来低下するはずの感染増殖能が増加する肺炎クラミジア遺伝子破壊株の探索

宿主細胞のシグナル応答や代謝応答に変化が生じる肺炎クラミジア遺伝子破壊株の栄養要求性がどのように変化するか

これらの評価により、これまで明らかにされていなかった ~ の感染分子機構を明らかにすることができる。また、これらが解明されることにより、これまで治療失敗に終わる可能性のあった抗生物質投与とは異なる新たな創薬標的分子の発見につながることを期待される。

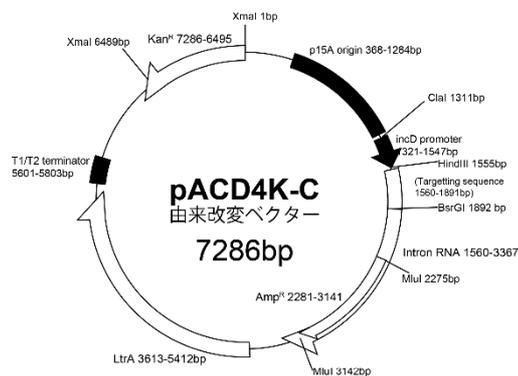


図1 作製予定の遺伝子破壊ベクターの遺伝子地図

4. 研究成果

まず、トラコーマクラミジアにおいて既に報告されている、グループ II イントロンによる逆スプライシング反応を利用した遺伝子破壊法と塩化カルシウムによる形質転換方法とを参考として遺伝子破壊ベクター用のプラスミド DNA 構築を実施した。プラスミドベクターの pACD4K-C (Invitrogen) を購入し、それを先行研究 (Johnson C, *PLOS ONE*, 2013) と同一の塩基配列となるプラスミドベクターへと遺伝子改変を実施した。そのプラスミド DNA に対してそれぞれ肺炎クラミジアの遺伝子 *incA*, *ompA*, *cpaf* についてグループ II イントロンを Targetronics によって設計し、配列解析により p15A 複製起点から intron RNA までの塩基配列を確認し、突然変異や予期せぬ組換えが発生していないことを確認した。それぞれの大腸菌クローンからミディプレップによりプラスミド DNA を精製し、制限酵素断片長を確認後 (図 2A)、塩化カルシウム法により肺炎クラミジア血清型 CWL029 に対し形質転換を実施した。しかしながら、Amp 耐性株を樹立することができず形質転換が誘導できなかった。このことから形質転換方法を変更し、電気穿孔法を用いた形質転換を試みた。先行研究 (Binet R, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2009) を参考として電気穿孔法による形質転換を試みたが、この方法によっても Amp 耐性株を樹立することができず、形質転換が誘導できなかった。そこで改めてプラスミド DNA の制限酵素断片長を確認したところ、同一のサンプルであったにも関わらず制限酵素断片長のパターンが変わりアガロースゲル電気泳動パターンが変わってしまっていた。(図 2B) 改めてミディプレップによりプラスミド DNA を精製したが、少しすると制限酵素断片長パターンは変化してしまうことの再現がとれた。

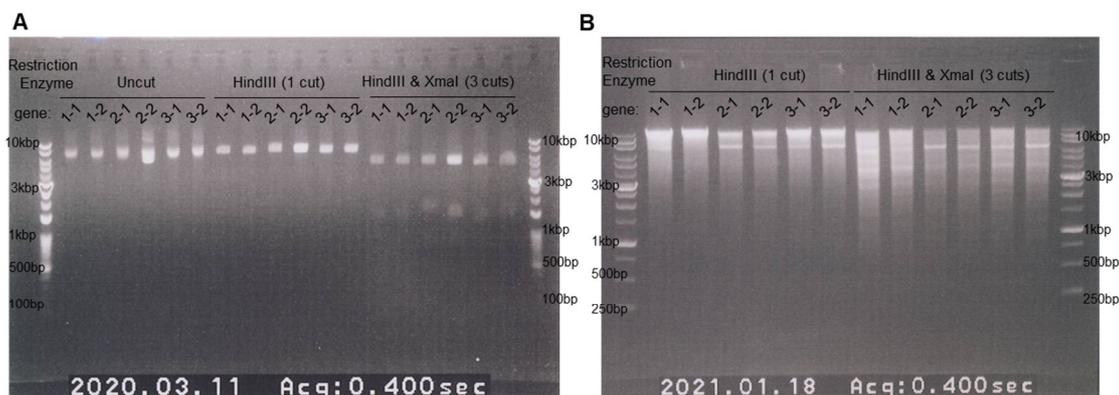


図2 RFLP法によるプラスミドDNA断片長の確認

A: プラスミドDNA 200µgをそれぞれ制限酵素なし、HindIII処理、HindIII & XmaI処理 (37°C、1時間) により消化し1.5% アガロースゲル電気泳動によりその断片長を確認した。マーカーはExcelBand™ 1 KB Plus (0.1-10 kb) DNA Ladder (SMOBio社、DM3200) を使用した。3つの遺伝子 (1: *incA*, 2: *ompA*, 3: *cpaf*) それぞれについて2種類ずつ Targetronics (http://www.targetrons.com/targetron_pLtrB.php) によって設計した。

B: プラスミドDNA 300µgをそれぞれ制限酵素なし、HindIII処理、HindIII & XmaI処理 (37°C、1時間) により消化し1.5% アガロースゲル電気泳動によりその断片長を確認した。マーカーはExcelBand™ XL 25 kb DNA Ladder, Broad Range (SMOBio社、DM4100) を使用した。プラスミドDNAサンプルは図2Aと同じものを使用した。

その一方でトラコーマクラミジア血清型 L2/434/Bu 由来のプラスミド DNA : pL2 を用いてクラミジア遺伝子再発現用のプラスミドベクターの作製を実施した。このプラスミド DNA は大腸菌内で複製されないため、大腸菌用のプラスミドベクターである pBR322 と融合させ大腸菌内で複製可能なクラミジアプラスミド DNA を作製した。このプラスミド DNA に遺伝子破壊後の遺伝子再発現用の遺伝子配列を組み込み、遺伝子再発現用プラスミドベクターとして利用することを計画している。遺伝子再発現用プラスミドベクターに蛍光遺伝子である *egfp* などを組み込むことにより、作製したプラスミドベクターが機能しているかについて解析を実施している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kurihara Yusuke, Walenna Nirwana Fitriani, Ishii Kazunari, Soejima Toshinori, Chou Bin, Yoshimura Michinobu, Ozuru Ryo, Shimizu Akinori, Itoh Ryota, Furuhashi Masato, Hotamisligil Gokhan S., Hiromatsu Kenji	4. 巻 210
2. 論文標題 <i>Chlamydia pneumoniae</i> Lung Infection in Mice Induces Fatty Acid-Binding Protein 4-Dependent White Adipose Tissue Pathology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1086 ~ 1097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2200601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshimura Michinobu, Sakamoto Atsuhiko, Ozuru Ryo, Kurihara Yusuke, Itoh Ryota, Ishii Kazunari, Shimizu Akinori, Chou Bin, Sechi Yusuke, Fujikane Aya, Nabeshima Shigeki, Hiromatsu Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Insufficient anti-spike RBD IgA responses after triple vaccination with intramuscular mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e23595 ~ e23595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2023.e23595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimura Michinobu, Sakamoto Atsuhiko, Ozuru Ryo, Kurihara Yusuke, Itoh Ryota, Ishii Kazunari, Shimizu Akinori, Chou Bin, Nabeshima Shigeki, Hiromatsu Kenji	4. 巻 139
2. 論文標題 The appearance of anti-spike receptor binding domain immunoglobulin G4 responses after repetitive immunization with messenger RNA-based COVID-19 vaccines	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijid.2023.11.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------