

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790419

研究課題名（和文）肺炎クラミジアエフェクター分子の同定と宿主細胞における機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of two kinds of novel *Chlamydophila pneumoniae* effectors.

研究代表者

築取 いずみ (YANATORI IZUMI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：40454847

研究成果の概要（和文）：本研究では、新しく2つの肺炎クラミジア特異的エフェクター分子、Fke034 および Fke063、の同定に成功した。また、これらの分子について機能解析を進めたところ、Fke034 は宿主細胞内で PACSIN2 と結合し、その機能調節を行っていることが示唆された。また、Fke063 はカハール小体に局在し、宿主細胞内小胞輸送に影響を及ぼしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this research, we identified two novel *Chlamydophila pneumoniae* specific effectors, Fke034 and Fke063. Functional analysis revealed that Fke034 interacts with PACSIN2 and might control the function of PACSIN2 in the host cells, and Fke063 is localized at Cajal body and might affect the intracellular vesicle trafficking system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：病原性

1. 研究開始当初の背景

近年、多くの病原微生物が有するⅢ型分泌装置やⅣ型分泌装置の発見により、細菌が宿主内へエフェクターと呼ばれる細菌由来蛋白質を送り込み、積極的に宿主と相互作用をし、宿主の生理的機能を攪乱させることで、より強い病原性を発揮していることが知られるようになった。

肺炎クラミジアは集団生活を開始する小児期に初感染を起こし、成人では抗体保有率が50%以上にのぼる。また一度肺炎クラミジアに感染した後も終生免疫は獲得されず、持

続感染を引き起こすことも知られている。有効なワクチンの開発は未だなされておらず、予防・治療が困難な疾患の1つである。そこで、肺炎クラミジアの感染戦略を明らかにし、新たな治療薬の開発につなげるべく、エフェクター分子の同定・機能解析を行うことを目的とし、本研究を行うこととした。これまでに、申請者の研究室では、肺炎クラミジア機能未知蛋白分子455個について、酵母発現系を用いた網羅的にスクリーニングを行った。その結果、発現酵母において増殖抑制を示す69個のエフェクター候補分子を見出して

た。そこで、本研究ではこれらの候補分子の中から真のエフェクター分子を同定し、機能解析を行うことを目的とし、研究をすすめた。

2. 研究の目的

現在までに、申請者の研究室では酵母発現系による病原因子の網羅的スクリーニングを行った結果、69個のエフェクター候補因子を見出してきた。そこでさらにこの研究を進展させるために、次の2項目について明らかにすることを目標に研究を遂行する。

(1) 肺炎クラミジアエフェクター因子の同定

現在、エフェクター因子として選定した69個の蛋白は酵母に対する増殖抑制を示すという特徴を有するが、実際に宿主細胞内に注入され、宿主細胞の生理活性に影響しているかは不明である。そこで、肺炎クラミジア感染細胞内で、これらエフェクター候補分子が実際に宿主細胞内への移行を示すかを確認し、移行を認めたものについては、肺炎クラミジアのエフェクター因子として同定する。

(2) エフェクター分子の宿主細胞内での機能解析

(1)で同定したエフェクター分子について、さらに宿主細胞に及ぼす影響について詳細に解析を進める。エフェクター因子が宿主に影響を及ぼす機能については、エフェクター因子の宿主細胞での局在、感染のどの段階で宿主細胞に移行しているか等を経時的に調べることにより、機能の概要を予測する。また、宿主細胞のどのような蛋白と相互作用し感染を成立させているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肺炎クラミジアエフェクター分子の同定

① エフェクター候補分子に対する抗ウサギポリクローナル抗体の作製および、感染細胞内でのエフェクター候補分子の動向観察。

肺炎クラミジアエフェクター候補分子に対する特異的ポリクローナル抗体を作成する。これを用いて、感染細胞の免疫染色を行い、エフェクター候補分子の中で、肺炎クラミジアから宿主細胞へと移行しているものを、真のエフェクター分子と同定する。

(2) エフェクター分子の機能解析

① エフェクター分子の宿主細胞内での局在解析。

GFP-tagしたエフェクター分子をHEp-2細胞に導入し、その細胞内局在を種々のオルガネラマーカーと比較し解析する。またエフェクター分子を導入した際の経時的な局在お

よび細胞形態的变化を細胞生物学的および生化学的に解析する。

② 肺炎クラミジアエフェクター分子と結合する宿主細胞の分子を同定する。

Yeast Two-hybrid法による解析、およびGST pull down法による結合タンパク質の同定を試みる。

4. 研究成果

本研究により2つの新規肺炎クラミジア特異的エフェクター分子、Fke034およびFke063、を同定することに成功した。また、それぞれの分子について機能解析を行ったところ、以下のような特徴をもつ分子であることが明らかとなった。

(1) 肺炎クラミジアエフェクター分子 Fke034

① 宿主細胞内局在および感染細胞への移行時期：

Fke034-GFPを酵母およびヒトHEp-2細胞に発現させると、一部は細胞膜に局在することを見出した。そこで、様々なFke034の部分欠損株を作成し、詳細な局在解析を行ったところ、Fke034の中央部分が、細胞膜への結合に重要であることが判明した。また、肺炎クラミジア感染細胞にて、Fke034の発現を経時的に観察したところ、感染後6時間以内の早期に宿主細胞内に放出されていることを確認した。以上より、Fke034は感染初期に宿主細胞へ放出され、宿主細胞膜へと局在することを明らかにした。

② Fke034と結合する宿主細胞内分子の探索：

Fke034にはそのC末端にproline-rich repeatがある。この領域に注目し、様々なGST-Fke034欠損株を作成した。このGST-Fke034を大腸菌で発現させ、GST pull-down法により、宿主細胞内で結合する分子の探索を行ったところ、約60kDaのタンパク質と特異的に結合しており、この分子がPACSN2であることが明らかとなった(図1)。

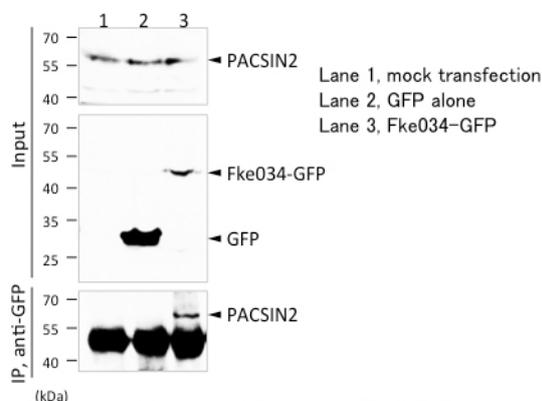


図1 Fke034はPACSN2と結合する

さらに、PACSN2の種々の欠損株を作成し、

Fke034 との結合領域を探索したところ、PACSIN2 の C 末端に存在する SH3 領域が、Fke034 との結合に必要なかつ十分な領域であることを明らかにした。

③ 肺炎クラミジア感染細胞での Fke034 と PACSIN2 の挙動解析：

細胞質内に点状に局在する PACSIN2 は、Fke034-GFP を共発現させることにより、細胞膜に局在するように変化する。また、肺炎クラミジア感染細胞においては、Fke034 が宿主細胞に検出される感染後 6 時間以内では、PACSIN2 が細胞膜に局在するように変換することが観察された。

④ 以上の結果のまとめ、および今後の展開：以上より、Fke034 は肺炎クラミジア感染後、宿主細胞へと放出されるエフェクター分子であると同定した。また、感染初期に宿主細胞に移行し、PACSIN2 と結合することで、その機能を調節し、肺炎クラミジアの感染に有利に働いている可能性が示唆された。今回、PACSIN2 と結合する肺炎クラミジアエフェクター分子の同定に、世界で初めて成功した。しかしながら、PACSIN2 は、細胞骨格の再編成、アポトーシスの制御など非常に多くの機能をもつことが知られている。Fke034 が PACSIN2 と結合することで、PACSIN2 のどの機能を制御しているかについては、今後さらなる解析を行う必要がある。Fke034 が感染の非常に初期に発現していることから、PACSIN2 の作用を攪乱することで、感染を成立させている可能性が考えられる。Fke034 の詳細な機能解析は、肺炎クラミジアの感染機構の解明に重要な知見をもたらすものと考えられる。

(2) 肺炎クラミジアエフェクター分子 Fke063

① 宿主細胞内局在および、感染細胞での発現時期について：

GFP-tag した Fke063 を酵母およびヒト HEp-2 細胞に発現させると、いずれも核内に局在していることがわかった。そこで、HEp-2 細胞に Fke063-GFP を発現させ、種々のオルガネラマーカーと局在を比較したところ、核内の特にカハール小体に局在していることが判明した。また、肺炎クラミジア感染細胞にて、Fke063 の発現を経時的に観察したところ、感染後 24 時間以内に宿主細胞内に放出されていることを確認した。以上より、Fke063 は感染初期に肺炎クラミジアから宿主細胞へと移行し、その後カハール小体へ局在する分子であることを明らかにした。

② Fke063 発現酵母を用いた機能解析について：

インペルターゼ融合カルボキシペプチターゼ Y タンパク質発現酵母を用いて、細胞内小胞輸送異常を引き起こす作用の有無につい

て検討を行った。インペルターゼ融合カルボキシペプチターゼ Y タンパク質発現酵母では、この組換えタンパク質はリソソームへと輸送される。しかし、この酵母に小胞輸送の異常を引き起こすタンパク質発現させると、細胞外と分泌されるように変化する。これを指標に、Fke063 が細胞内小胞輸送の異常を引き起こす作用があるかを検討した。その結果、Fke063 は酵母において、細胞内輸送異常を引き起こすことが明らかとなった (図 2)。

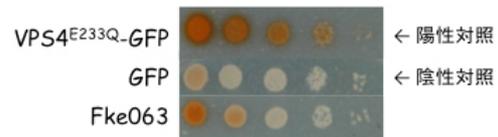


図2 Fke063は細胞内小胞輸送障害を引き起こす

③ 肺炎クラミジア菌体での Fke063 の局在について：

免疫電子顕微鏡法により、肺炎クラミジア菌体での Fke063 の局在を解析したところ、Fke063 は菌体表面に発現していることが明らかとなった。そこで、抗 Fke063 特異的抗体を用いて感染抑制能を検討したところ、図 3 に示すように、この抗体によって約 50% の感染効率の低下を認めた。

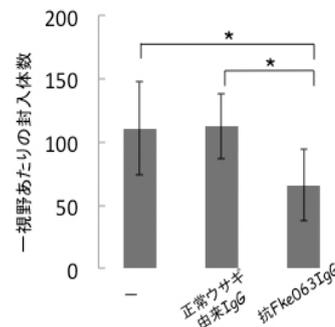


図3 抗Fke063抗体は肺炎クラミジア感染抑制効果をもつ

④ 以上の結果のまとめ、および今後の展開：以上より、Fke063 は肺炎クラミジア感染後、宿主細胞へと移行するエフェクター分子であると同定した。Fke063 は感染後約 24 時間以内に宿主細胞検出されることから、感染の比較的早期に作用していることが考えられる。また、Fke063 は肺炎クラミジア菌体の表面に存在し、その後、宿主細胞へ移行すると核のカハール小体へ局在するようになる。さらに、Fke063 の機能として、細胞内小胞輸送の異常をひき起こしていることが示唆された。抗 Fke063 抗体が肺炎クラミジアの感染抑制効果をもつことを見出したことは、今後のワクチン開発へ非常に重要な意味をもつ。また、菌体表面に存在する Fke063 がいかにして、肺炎クラミジアから宿主細胞へ放出しているかを明らかにすることができた

ならば、エフェクター分子の注入方法について、新たな知見をえることができるであろう。さらに、偏性細胞内寄生性細菌である肺炎クラミジアは、宿主細胞内で生存・増殖を可能にするために、ファゴソーム-リソソーム融合阻害を起こす必要がある。Fke063 が細胞内小胞輸送の異常を引き起こすことは、この分子が宿主内での持続感染を可能にする分子の一つであることが推測される。今後は、現在までに明らかにした局在・機能の関連付けを行うとともに、より詳細な機能解析を進めることで、Fke063 の肺炎クラミジア感染における重要性を明らかにしていく必要がある。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Yanatori I., Yasui Y., Miura K., Kishi K. Genomic screening for the novel effector molecules in *Chlamydomonas pneumoniae* using growth inhibitory effect in yeast cells. 6th Biennial Meeting of the Chlamydia Basic Research Society. 3/19/2013 San Antonio (USA)
- ② Kawai Y., Miura K., Katayama A., Yasui Y., Yanatori I., Ouchi K. and Kishi F. Characterization on an effector candidate Fke063 in *Chlamydomonas pneumoniae*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 9/7/2011 札幌市
- ③ Miura K., Kawai Y., Katayama A., Yanatori I., Yasui Y., Kishi F. Screenig and analysis of effector candidate molecules from *Chlamydomonas pneumoniae* genome. The 111th ASM General Meeting. 5/24/2011 New Orleans (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築取 いずみ (YANATORI IZUMI)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：40454847

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：