

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590505

研究課題名(和文)肺炎クラミジアの新規エフェクター分子CpB0850の細胞分裂調節機構の解明

研究課題名(英文)Effect of a potential Chlamydial effector protein, CpB0850 on cell cycle progression of host cells

研究代表者

平井 到(Hirai, Itaru)

琉球大学・医学部・教授

研究者番号：00359994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では市中肺炎の原因菌である肺炎クラミジアの宿主に対する影響を調査した。その結果、肺炎クラミジア感染が宿主細胞のシグナル情報伝達経路を調節し、宿主細胞の細胞増殖抑制を行う機構の一旦が明らかにされた。また、肺炎クラミジアの潜在的な毒素タンパク質と考えられるCpB0850分子が宿主細胞の核内に局在し、宿主細胞の核内タンパク質ヒストンH3との相互作用ならびにリン酸化の調節を介して、宿主細胞の細胞周期に影響を与えている可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined effect of Chlamydia pneumoniae infection on host cells. Cell growth of host cells were suppressed by C. pneumoniae infection through modification of certain signal transduction pathway. In addition, it was suggested that a potential Chlamydial effector protein, CpB0850 might effect on cell cycle progression through interaction with host cellular chromosomal protein.

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：遺伝子 細菌 微生物

1. 研究開始当初の背景

(1) クラミジアは偏性細胞内寄生性細菌であることから、クラミジアの培養や菌株のクローニングが困難であり、通常の細菌研究では常套法である遺伝子変異・欠損株のライブラリー作製が容易に行えない。このようなことから国内、国外を問わずクラミジア感染がどのように宿主細胞の機能を調節するかに関する解析は進んでおらず、クラミジア感染によって引き起こされる病態の解明が妨げられている。

(2) 我々の研究によって、肺炎クラミジア感染によって宿主細胞の増殖が抑制されることが明らかにされたが、その分子機構は明らかではなく、クラミジア感染によって宿主細胞のシグナル情報伝達経路が修飾されるかどうかや、修飾されるとすればどのようなシグナル情報伝達経路が修飾されるかについては明らかではなかった。

(3) クラミジアのエフェクター分子の同定についても質量分析を用いた研究や他の菌種の分泌装置を用いた研究などによりいくつかの報告があるが、その多くは分泌タンパク質であることの証明、あるいはエフェクタータンパク質の宿主細胞内での局在を示したものであり、エフェクタータンパク質の機能解析に迫った報告は限定されていた。

2. 研究の目的

(1) 肺炎クラミジア感染によって宿主細胞の細胞周期の抑制が行われるが、どのような機構によって調節されているかについて、シグナル情報伝達経路の関与も含めて検討する。

(2) 肺炎クラミジアが産生するエフェクター分子の可能性のある分子として同定された CpB0850 分子の宿主細胞における機能について、明らかにする。特に宿主細胞のクロマチンとの分子会合とその影響について検討する。

(3) 遺伝子操作の難しい肺炎クラミジアに感染するクラミジアファージを用いて組み換えクラミジアファージによる遺伝子導入システムの作成を検討する。

3. 研究の方法

(1) 肺炎クラミジア感染による宿主細胞の細胞周期調節について

宿主細胞としてヒト T 細胞白血病株 Jurkat を用いる。Jurkat 細胞に様々な感染多重度で肺炎クラミジアを感染させ、一定時間後に感染細胞を回収し、細胞増殖、死細胞率などを測定した。

Jurkat 細胞に肺炎クラミジアを様々な感染多重度で感染させ、一定時間後に感染細胞

を回収し、細胞ライセートを作製した。作成した細胞ライセートを用いてシグナル情報伝達経路関連分子に対する抗体および、同分子の活性化状態に対する抗体を用い、イムノプロット解析を行った。

Jurkat 細胞に様々なシグナル情報伝達経路の阻害剤を作用させ、作用後に様々な感染多重度で肺炎クラミジアを感染させた。一定時間後に感染細胞を回収し、細胞ライセートを調製した後に、イムノプロット解析を行った。

(2) エフェクター分子の可能性のある CpB0850 分子の機能解析

肺炎クラミジアから CpB0850 遺伝子を分子クローニングし、緑色蛍光タンパク質 EGFP 分子との融合タンパク質を発現する発現プラスミドを構築した。構築した発現プラスミドを用い、C 末端の欠如した EGFP-CpB0850 タンパク質を発現する発現プラスミドを作製した。

HEK293T 細胞に で作製した発現プラスミドをトランスフェクションに用い、該当融合タンパク質を発現させ、細胞内局在について確認した。また、細胞増殖数を測定し、発現融合タンパク質の宿主細胞の増殖能への影響を解析した。

HEK293T 細胞に で作製した発現プラスミドをトランスフェクションに用い、該当融合タンパク質を発現させ、免疫沈降法によって宿主細胞のクロマチン共沈されるかについてイムノプロットにより解析した。

EGFP 分子と CpB0850 分子の融合タンパク質を恒常的に発現する細胞株を樹立する目的で、 で作製した発現プラスミドの一部に Lox 配列で挟まれたピューロマイシン耐性遺伝子を配置した発現プラスミドを作製した。HEK293T 細胞にヒドロキシタモキシフェン(4HT)により細胞内の細胞質から核内へと細胞内の局在を変化させる Cre リコンビナーゼを恒常的に発現する細胞を樹立し、この樹立した細胞に、上記の発現プラスミドをトランスフェクションに用い、ピューロマイシンで選択することにより、4HT により EGFP 分子と CpB0850 分子との融合タンパク質が誘導的に発現される細胞株を樹立した。

上の で樹立した細胞株を用い、4HT の存在下で細胞増殖数を計測し、EGFP 分子と CpB0850 分子の融合タンパク質の宿主細胞増殖における影響を解析した。

(3) 肺炎クラミジアに感染するクラミジアファージを用いた遺伝子導入系確立の検討

遺伝情報からクラミジアファージのゲノム構造を解析し、潜在的なクラミジアファージの遺伝子を特定した。

得られた遺伝情報に基づいてプライマーを作製し、該当遺伝子の分子クローニングを行った。得られた遺伝子を用い発現プラスミ

ドを作製した。

上の で作製した発現プラスミドを用いて大腸菌株を形質転換し、発現誘導を行い、イムノプロット解析を行った。

4. 研究成果

(1) 肺炎クラミジア感染による宿主細胞の細胞周期調節について

肺炎クラミジア感染によって Jurkat 細胞の細胞増殖が感染多重度異存的に抑制されることが明らかとなった。この細胞増殖抑制は、若干の視細胞を伴っていたものの、アポトーシスの指標である、活性化カスパーゼ3や活性化カスパーゼ7の増加は観察されなかった。このことから肺炎クラミジアによる Jurkat 細胞の細胞増殖抑制は単に細胞死が誘導された結果ではないことが示唆された。また、サイトカラシンDを用いた実験によって、サイトカラシンD処理によって肺炎クラミジア感染による Jurkat 細胞の増殖抑制が解除されたことから、肺炎クラミジア感染が Jurkat 細胞の増殖抑制に必要であることが示唆された。UV処理や熱処理によって生えクラミジアの死細胞を調製し、これらの肺炎クラミジア死細胞を用いた感染実験では Jurkat 細胞の増殖抑制は見られなかった。以上のことから Jurkat 細胞の増殖抑制には生きた肺炎クラミジアの感染が重要であることが示唆された。

各種のシグナル情報伝達経路を阻害する薬物の使用によって、肺炎クラミジア感染による Jurkat 細胞の細胞増殖抑制にどのような影響がみられるか検討した結果、MEK 経路や PKA 経路については影響が見られず、mTOR 経路阻害剤によってのみ肺炎クラミジアによる Jurkat 細胞の増殖抑制が解除された。このことから肺炎クラミジアによる Jurkat 細胞の増殖抑制経路には mTOR 経路が関与していることが示唆された。

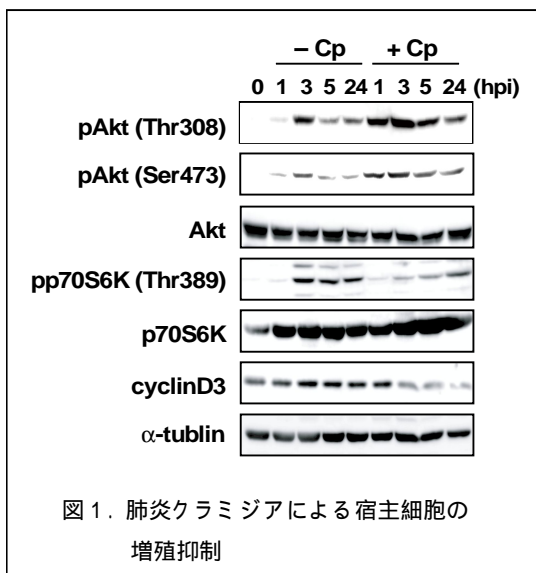


図1. 肺炎クラミジアによる宿主細胞の増殖抑制

Jurkat 細胞の増殖抑制にはサイクリン D3 分子の関与が強く示唆されていることから肺炎クラミジア感染によるサイクリン D3 分

子の発現状況について検討した結果、肺炎クラミジア感染によってサイクリン D3 分子の発現量抑制が観察された。このサイクリン D3 分子の発現量抑制はUVや熱処理による肺炎クラミジア死細胞を用いた感染実験では確認されず、また、サイクリン D3 分子の発現抑制は肺炎クラミジアの感染多重度に依存して観察されたことから、肺炎クラミジア感染によって、サイクリン D3 分子の発現抑制が起こることによって Jurkat 細胞の増殖抑制が誘導されることが示唆された。

通常のシグナル情報伝達では p70S6K 分子は活性化した AKT 分子が mTOR 分子を活性化し p70S6K 分子を活性化するが、肺炎クラミジアに感染した Jurkat 細胞から調製した細胞ライセートを用いてイムノプロットを行った結果、肺炎クラミジアによって AKT 分子の活性化は観察されたものの、その下流である p70S6K 分子の活性化は観察されなかった (図1)。mTOR 分子はいくつかのシグナル情報伝達経路によって調節されているため、AKT による調節だけでなく、他のシグナル情報伝達経路の関与が示唆された。

以上のことから肺炎クラミジアは mTOR 経路下流の p70S6K 分子の活性化を調節し、サイクリン D3 分子の発現量を抑制することで宿主細胞 Jurkat の増殖抑制を行うことが示唆された。

(2) エフェクター分子の可能性のある CpB0850 分子の機能解析

HEK293T 細胞に EGFP 分子と CpB0850 分子の C 末端からの欠失変異体との融合タンパク質を発現させ、該当融合タンパク質の細胞内局在を調べたところ、野生型の CpB0850 分子と EGFP 分子との融合タンパク質は核内のみとその局在が限定されたものの、C 末端の約 70 アミノ酸を欠失させることで、EGFP-CpB0850 融合タンパク質の細胞内局在が細胞全体に拡散された。このことから、CpB0850 分子の C 末端側に核内の局在に必要な配列があることが示唆された。また、細胞分画実験の結果からは、野生型の CpB0850 分子と EGFP 分子の融合タンパク質はクロマチン分画にのみ回収されたのに比較し、C 末端の欠失変異株はクロマチン分画のみならず、細胞質分画にまで回収され、蛍光顕微鏡による細胞内局在の結果と矛盾を生じなかった。

HEK293T 細胞に EGFP 分子と CpB0850 分子との融合タンパク質を発現させ、細胞周期の分布を調べたところ、野生型の CpB0850 分子と EGFP 分子の融合タンパク質を発現している細胞では、G2/M 期の比率が高く、G2/M 期に細胞周期の停滞が起こっている可能性が示唆された。一方、CpB0850 分子の C 末端欠失変異体と EGFP 分子との融合タンパク質を発現させた細胞では、G2/M 期の細胞比率は野生型 CpB0850 分子発現株に比較して低く、CpB0850 分子の核内への局在、

あるいは、クロマチンへの局在が HEK293T 細胞の細胞周期の停滞に重要であることが示唆された。

HEK293T 細胞に EGFP 分子と野生型 CpB0850 分子の融合タンパク質もしくは EGFP 分子のみを発現させ、EGFP に対する抗体で免疫沈降したところ、EGFP 分子のみを発現させた細胞ライセートからは回収されなかったものの、EGFP 分子と CpB0850 分子の融合タンパク質を発現させた細胞ライセートからはヒストンが共沈された。この結果は CpB0850 分子がヒストン分子と分子会合していることを示唆した。この点を踏まえてヒストン H3 のいくつかのリン酸化部位に対する抗体を用い、EGFP 分子と CpB0850 分子の融合タンパク質発現下におけるヒストン H3 のリン酸化の変化について検討した

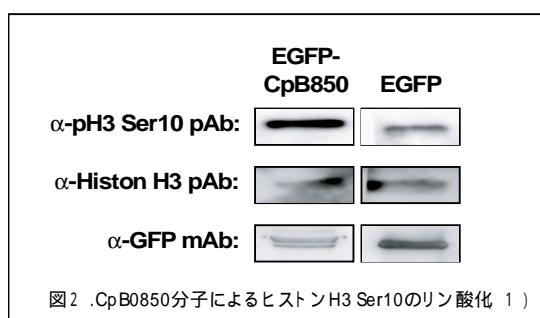


図2 .CpB0850分子によるヒストンH3 Ser10のリン酸化 1)

ところ、Ser10 のリン酸化については再現よく観察された (図 2) 。他のリン酸化部位についてもリン酸化が時に観察されたものの、再現性が良くなかった。さらに、このヒストン H3 の Ser10 のリン酸化は細胞周期のマーカーとしても用いられていることから、肺炎クラミジアの感染とヒストン H3Ser10 のリン酸化を観察したところ、肺炎クラミジアの感染後 24 時間、48 時間、72 時間とそのリン酸化の程度が高くなった (図 3) 。

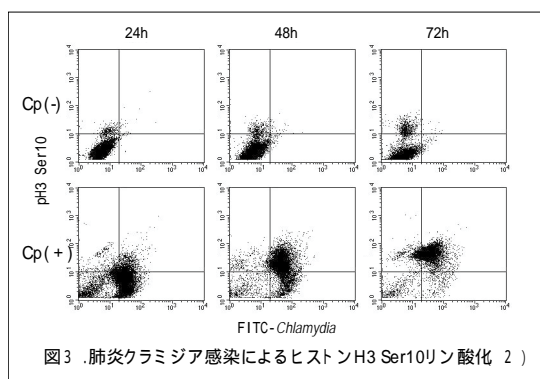


図3 .肺炎クラミジア感染によるヒストンH3 Ser10リン酸化 2)

CpB0850 の宿主細胞に対する影響を確認する目的で、EGFP 分子と CpB0850 分子の融合タンパク質を恒常的に発現する細胞の樹立を目指した。上の研究結果にあるように CpB0850 分子は宿主細胞を G2/M 期にアレストしてしまう可能性が考えられたため、通常の方法では恒常的に発現する細胞の樹立は困難であることが推察された。そのため、実験方法に記載した方法を用い、発現誘導株の樹立を目指した。樹立の過程で野生型

CpB0850 分子と EGFP 分子を発現している細胞株は 4 HT の存在下、すなわち発現が誘導されている状況化では EGFP 分子のみを発現している細胞と比較し、その細胞増殖濃度は遅く、恒常的に発現する細胞にあっても CpB0850 分子の宿主細胞への作用が観察された。しかしながら株細胞樹立の段階で徐々に EGFP と CpB0850 分子との融合タンパク質の誘導発現量の低下が観察され、十分な発現量を維持した株細胞の樹立は本研究期間中には達成できなかった。

(3) 肺炎クラミジアに感染するクラミジアファージを用いた遺伝子導入系確立の検討

肺炎クラミジア AR39 株はクラミジアファージを溶原化していることが知られている。この性質を利用し、肺炎クラミジア AR39 株からクラミジアファージの染色体全体を分子クローニングし、組み換えクラミジアファージを用いた肺炎クラミジアに対する遺伝子導入系の確立が可能かどうかについて検討を行った。肺炎クラミジア AR39 株のホルマリン固定検体を PCR 法の鋳型として用い、PCR 法による増幅を行ったところ、遺伝情報と同様の長さの DNA を回収した。回収した DNA をクローニングベクターにクローニングし、これ以降のクラミジアファージが発現していると想定される遺伝子のクローニングに用いる鋳型 DNA とした。

小型のウイルスである phiX174 のウイルス構造及び染色体の比較、および遺伝子バンクに収載されている情報により、肺炎クラミジア AR39 に感染するクラミジアファージが発現していることが想定される遺伝子を仮同定した。仮同定した遺伝子それぞれについてプライマーを設計し、得られた鋳型 DNA を用いて PCR 法によって増幅し、大腸菌における発現プラスミドを構築した。その結果遺伝子によっては十分な発現が見込まれるもの、宿主大腸菌を溶菌させるもの、発現の認められないものが観察された。

上の および の研究結果を踏まえ、肺炎クラミジア AR39 に実際に発現しているクラミジアファージの遺伝子を特定し、その遺伝子をもとに発現系を作製することで、肺炎クラミジアに対する新しい遺伝子導入系の樹立につながる事が考えられた。

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 1 4 件)

Hirai I, Fukui N, Taguchi M, Yamauchi K, Nakamura T, Okano S, Yamamoto Y: Detection of chromosomal *bla*_{CTX-M-15} in *Escherichia coli* O25b-B2-ST131 isolates from the Kinki region of Japan. Int J Antimicrob Agents. 2013, 42(6):500-6. 査読有

Luvsansharav UO, Hirai I, Niki M, Nakata A, Yoshinaga A, Yamamoto A, Yamamoto M, Toyoshima H, Kawakami F, Matsuura N, Yamamoto Y: Fecal carriage of CTX-M β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in nursing homes in the Kinki region of Japan. *Infect Drug Resist.* 2013, 22:6:67-70. 査読有

Sasaki T, Setthapramote C, Kurosu T, Nishimura M, Asai A, Omokoko MD, Pipattanaboon C, Pitaksajakul P, Limkittikul K, Subchareon A, Chaichana P, Okabayashi T, Hirai I, Leuangwutiwong P, Misaki R, Fujiyama K, Ono KI, Okuno Y, Ramasoota P, Ikuta K: Dengue virus neutralization and antibody-dependent enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue patients at acute phase of secondary infection. *Antiviral Res.* 2013, 98(3):423-31. 査読有

Ishida K, Kubo T, Saeki A, Yamane C, Matsuo J, Yimin, Nakamura S, Hayashi Y, Kunichika M, Yoshida M, Takahashi K, Hirai I, Yamamoto Y, Shibata K, Yamaguchi H: *Chlamydomphila pneumoniae* in human immortal Jurkat cells and primary lymphocytes uncontrolled by interferon- γ . *Microbes Infect.* 2013, 15(3):192-200. 査読有

Hirai I, Ebara M, Nakanishi M, Yamamoto C, Sasaki T, Ikuta K, Yamamoto Y: Jurkat cell proliferation is suppressed by *Chlamydia (Chlamydomphila) pneumoniae* infection accompanied with attenuation of phosphorylation at Thr389 of host cellular p70S6 K. *Immunobiology.* 2013, 218(4):527-532. 査読有

Setthapramote C, Sasaki T, Puiprom O, Limkittikul K, Pitaksajakul P, Pipattanaboon C, Sasayama M, Leuangwutiwong P, Phumratanaprapin W, Chamnachanan S, Kusolsuk T, Jittmittraphap A, Asai A, Arias JF, Hirai I, Kuhara M, Okuno Y, Kurosu T, Ramasoota P, Ikuta K: Human monoclonal antibodies to neutralize all dengue virus serotypes using lymphocytes from patients at acute phase of the secondary infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013, 432(1):200-1. 査読有

Luvsansharav UO, Hirai I, Nakata A, Imura K, Yamauchi K, Niki M, Komalamisra C, Kusolsuk T, Yamamoto Y: Prevalence of and risk factors associated with fecal carriage of CTX-M β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in rural Thai communities. *J Antimicrob Chemother.* 2012, 67(7):1769-74. 査読有

Kubo T, Ishida K, Matsuo J, Nakamura

S, Hayashi Y, Sakai H, Yoshida M, Takahashi K, Hirai I, Yamamoto Y, Yamaguchi Y: *Chlamydia trachomatis* serovar L2 infection model using human lymphoid Jurkat cells. *Microb Pathog.* 2012, 53(1):1-11. 査読有

Nakamura T, Komatsu M, Yamasaki K, Fukuda S, Miyamoto Y, Higuchi T, Ono T, Nishio H, Sueyoshi N, Kida K, Satoh K, Toda H, Toyokawa M, Nishi I, Sakamoto M, Akagi M, Nakai I, Kofuku T, Orita T, Wada Y, Zikimoto T, Koike C, Kinoshita S, Hirai I, Takahashi H, Matsuura N, Yamamoto Y: Epidemiology of *Escherichia coli*, *Klebsiella* Species, and *Proteus mirabilis* Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases From Clinical Samples in the Kinki Region of Japan. *Am J Clin Pathol.* 2012, 137(4):620-6. 査読有

Niki M, Hirai I, Yoshinaga A, Ulzii-Orshikh L, Nakata A, Yamamoto A, Yamamoto M, Yamamoto Y: Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the feces of carriers contribute substantially to urinary tract infections in these patients. *Infection.* 2011, 39(5):467-71. Epub 2011 Aug 9. 査読有

仁木 真理恵, 平井 到, 山本 容正: 医療系学生における基質特異性拡張型ラクタマーゼ産生腸内細菌保持率, 日本環境感染学会誌 2011, 26 (3): 154-156, 2011. 査読有

Kobayashi M, Ishida K, Matsuo J, Nakamura S, Nagasawa A, Motohashi K, Yao T, Hirai I, Yamamoto Y, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Yamaguchi H: *Chlamydomphila pneumoniae* attachment and infection in low proteoglycan expressing human lymphoid Jurkat cells. *Microb Pathog.* 2011, 51(3):209-16. 査読有

Luvsansharav UO, Hirai I, Niki M, Sasaki T, Makimoto K, Komalamisra C, Maipanich W, Kusolsuk T, Sa-Nguankiat S, Pubampen S, Yamamoto Y: Analysis of risk factors for a high prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in asymptomatic individuals in rural Thailand. *J Med Microbiol.* 2011, 60(Pt 5):619-24. 査読有

Luvsansharav UO, Hirai I, Niki M, Nakata A, Yoshinaga A, Moriyama T, Yamamoto Y: Prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among healthy adult people in Japan. *J Infect Chemother.* 2011, 17(5):722-5. 査読有

{ 学会発表 } (計 6 件)

Itaru Hirai, Dissemination of CTX-M type ESBL-producing bacteria in Southeast Asian countries., 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 日 ~ 28 日、東京
H. Bui, I. Hirai, T. Nguyen, V. Ha, N. Bui, H. Phan, T. Le, S. Ueda, H. Watabe, H. Le, Y. Yamamoto, High Prevalence of Extended Spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Household Members of a Rural Area in Vietnam., 53rd ICAAC 10-13, Sept, 2013, Denver, CO

平井 到, 山内 紘, 山本 容正, 健康人由来 CTX-M 型 ESBL 産生菌株における ESBL 遺伝子の存在形態と地理的分布の関連性, 第 86 回日本西院学会総会, 2013 年 3 月 18 日 ~ 20 日、千葉市

Naoki Fukui, Itaru Hirai, Arisa Nakata, Aya Yoshinaga, Ulzii-Orshikh Luvsansharav, Tatsuya Nakamura, Yoshimasa Yamamoto, A sequencing analysis of genetic environment surrounding *bla*_{CTX-M-15} in *Escherichia coli*., 第 85 回日本細菌学会総会, 2012 年 3 月 27 日 ~ 29 日、長崎市

Ulzii-Orshikh Luvsansharav, Itaru Hirai, Arisa Nakata, Kaori Imura, Kou Yamauchi, Marie Niki, Chalit Komalamisra, Teera Kusolsuk, Yoshimasa Yamamoto, A 2-year trend of CTX-M beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in asymptomatic Thai people., 第 85 回日本細菌学会総会, 2012 年 3 月 27 日 ~ 29 日、長崎市

Itaru Hirai, Masanori Matsuba, Yoshimasa Yamamoto, CELL DIVISION OF INFECTED CELLS IS RETARDED BY SECRETION OF A NOVEL EFFECTER PROTEIN, CPB0850, OF *CHLAMYDIA (CHLAMYDOPHILA) PNEUMONIAE*, The IUMS 2011 Sapporo Congress, 6 - 10, Sep, 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平井 到 (HIRAI, Itaru)
琉球大学・医学部・教授
研究者番号 : 00359994

(2) 研究分担者

山本 容正 (YAMAMOTO, Yoshimasa)
大阪府立公衆衛生研究所・所長
研究者番号 : 20010100

(3) 連携研究者

なし