

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670214

研究課題名(和文) 組換えファージによる肺炎クラミジアを標的とした新規遺伝子導入システムの開発

研究課題名(英文) Establishing of Chlamydia phage mediated novel gene transfer system for Chlamydia pneumoniae.

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は肺炎クラミジアに特異的に感染することが知られているクラミジアファージを用い、大腸菌と肺炎クラミジアの両方の細菌で複製することのできるシャトルベクターの作製、大腸菌を用いた組み換えクラミジアファージ作製用大腸菌株の樹立により、組み換えクラミジアファージを作成することを当初の目的とした。肺炎クラミジアAR39に感染しているクラミジアファージphiCPAR39から染色体をクローニングし、シャトルベクター作製に用いた。しかしクラミジアファージの構成タンパク質の特定及び大腸菌における発現を確認することはできず、大腸菌を用いた組み換えクラミジアファージ作製用大腸菌株を樹立ことはできなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to establish novel gene transfer system using a chlamydia phage phiCPAR39, which can infect Chlamydia pneumoniae. Chromosome of the chlamydia phage phiCPAR39, was cloned and utilized to construct a shuttle vector which can be replicated in both Chlamydia pneumoniae and Escherichia coli. To establish E. coli strain which produce recombinant chlamydia phage, expression of essential chlamydia phage proteins in E. coli cells were indispensable. However, expression of some of the chlamydia phage proteins were not confirmed. Consequently, E. coli strain, which would be utilized for production of the recombinant chlamydia phage, was not established.

研究分野：分子微生物学

キーワード：肺炎クラミジア 組み換えファージシステム

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺炎クラミジアは偏性細胞内寄生性細菌であり、通常の細菌のように培地を用いた培養を行うことが出来ず、その培養にはヒト由来細胞の存在が必要とされる。そのために微生物学で最も効果的な解析手法である、遺伝子の変異とクローン化による病原因子やエフェクターの同定、あるいは病態形成機構の解析手法を用いることができない。

(2) 肺炎クラミジアと類縁細菌種であるクラミジアトラコマティスではクラミジアトラコマティスが保持するプラスミドを用いた遺伝子発現系が開発され、用いられ始めているが、遺伝子導入株のクローン化と遺伝子導入クラミジアトラコマティス株の培養は効率的ではなく、その結果、遺伝子導入系が存在するクラミジアトラコマティスであっても、病原因子やエフェクター分子の特定は進んでいるとは言えない。

(3) 一般的にファージは宿主特異性が高く、感染高率は感染多重度(MOI, multiplicity of infection)に依存すると考えられている。そのため、ファージを密度勾配遠心法やポリエチレングリコールの使用などによりファージを回収し MOI を高くすることによって感染高率を上げることが可能である。

(4) 肺炎クラミジア AR39 株の全遺伝子配列が明らかにされ、肺炎クラミジア AR39 株に溶原化しているクラミジアファージ phiCPAR39 株の染色体配列も明らかにされた(Read TDら Nucleic Acids Res. 2000, 28(6):1397-406)。このことから、クラミジアファージ AR39 株をクローニングし、試験管内に置いて組み換えクラミジアファージ phiCPAR39 株の作製を試みる事が可能となった。

2. 研究の目的

(1) 肺炎クラミジアに感染するクラミジアファージを用い、肺炎クラミジアに感染することのできる組み換えクラミジアファージを作製する。

(2) 肺炎クラミジア AR39 株に溶原化しているクラミジアファージ AR39 株の染色地をクローニング、肺炎クラミジアと大腸菌の双方で複製可能なシャトルベクターを作製する。

(3) 組み換えクラミジアファージを構成するクラミジアファージタンパク質を発現する大腸菌株を作製し、本研究で作製したシャトルベクターを用いた形質転換によって組み換えクラミジアファージを作製する。

3. 研究の方法

(1) クラミジアファージ phiCPAR39 株のゲノムのクローニング

肺炎クラミジア AR39 株を ATCC (American Type Culture Collection) より購入し、HEp-2 細胞を宿主として培養を行った。培養した肺炎クラミジア AR39 株から全

DNA を精製し PCR の鋳型として用いた。

GenBank に収載されている遺伝情報 (Accession #: NC_002180) をもとにプライマーを作製し、PCR により phiCPAR39 のゲノムを増幅しクローニングベクター pCrbulnt(サーモフィッシュサイエンティフィック) にクローン化した。クローン化した遺伝子配列解析を行い、正しくクローニングされたか確認した。

(2) ORF の推定と発現プラスミドの作製
クラミジアファージ phiCPAR39 株の ORF は GenBank に収載された予測された phiCPAR39p1 ~ phiCPAR39p7 を用い、それぞれ ORF1 ~ ORF7 とした。収載された配列からプライマーを作製し、PCR 法により増幅したのち、Novagen 社の Duet Vectors を用いてクローニングした。プラスミドとク

表1 Duet vectorにサブクローニングしたphiCPAR39のORF

Vector	T7pro#1	T7pro#2
pETDuet	ORF5	-
pETDuet	-	ORF6
pETDuet	ORF5	ORF6
pACYCDuet	ORF1	-
pACYCDuet	-	ORF7
pACYCDuet	ORF1	ORF7
pCDFDuet	ORF2	-
pCDFDuet	-	ORF3, ORF4
pCDFDuet	ORF2	ORF3, ORF4

ローニングした ORF を表 1 にまとめた。

(3) 発現解析

表 1 に示したプラスミドを 1 ~ 7 種類の ORF を発現させるために、表 1 のプラスミドの 1 ~ 3 種類を大腸菌 BL21(DE3) の形質転換に用い、得られたクローンについて終濃度 1mM のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を発現誘導剤として用い、クラミジアファージ phiCPAR39 株由来 ORF のタンパク質発現を誘導した。誘導後集菌し、ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により発現タンパク質の確認を行った。タンパク質を発現させた大腸菌株を集菌し BugBuster (Novagen) により可溶性分画と不溶性分画に分離し、SDS-PAGE において組み換えたんぱく質の可溶性を評価した。

(4) シャトルベクターの作製

モデルシャトルプラスミドの作製
クラミジアファージ phiCPAR39 の ORF1 ~ ORF3 以外の部分を PCR で増幅した DNA 断片と pCOLADuet-1 プラスミドのカナマイシン耐性遺伝子、複製開始点 ColA 部分を増幅した DNA 断片を In-Fusion 試薬 (クロンテック) を用いて連結させた。得られたプラスミドをシャトルプラスミドのモデルとした。

モデルシャトルプラスミドを用いた組み換えファージ評価プラスミドの作製
 上記で得られたモデルプラスミドに本来の ORF1 の存在位置にクラミジアファージの外膜タンパク質 MOMP のプロモーター領域およびマーカーとして緑色蛍光タンパク質 GFP 遺伝子を導入した評価プラスミドを作製した。

4. 研究成果

(1) クラミジアファージ phiCPAR39 の ORF の発現状況の確認

クラミジアファージ phiCPAR39 の ORF の発現状況を確認するために、ORF 一つずつを発現するプラスミドによって形質導入された BL21(DE3)株を用い組み換えたんぱく質の発現状況を確認したところ、ORF1、4、5、7 の発現は確認されたものの、ORF2、3、6 については発現が確認されなかった。表 2 に各 ORF の長さやコードされているタンパク質の分子量を挙げる。

表2 各ORFがコードするタンパク質の生化学的特徴

ORF	長さ(bp)	等電点	分子量
ORF1	255	4.67	9499
ORF2	1662	6.12	61924
ORF3	561	10.20	20207
ORF4	447	4.71	16880
ORF5	108	10.26	3994
ORF6	96	4.56	3684
ORF7	984	9.40	39435

本研究においては、限定的な研究予算であることから、それぞれの ORF に対する抗体を作製することができなかったために、その発現状況を確認するためには、SDS - PAGE 上での新たなタンパク質バンドの形成による判定となり、判別が困難であったため、タンパク質のフォールディング(正しい立体構造となる過程)には問題となることも考えられたが、タンパク質の N 末端がわにヒスチジンタグを付加した発現プラスミドも作製し、それぞれの ORF の発現状況を確認したが、やはり、すべての ORF の発現が確認されることはなかった。これは単独で ORF を発現させた場合、いくつかの組み合わせで発現させた場合にも同様であり、⑦GenBank で推定された ORF をもとにした発現系の妥当性が疑われる、あるいは④ゲノムの存在がなければすべての ORF は発現しない、⑦大腸菌の菌内では正しい立体構造を取りにくい性質であるなどの可能性が推定される結果となった。

(2) GenBank で示唆されたクラミジアファージ phiCPAR39 の ORF の妥当性の評価上の(1)でしめされた ORF の妥当性について検討するために、他のクラミジアファ

ージでは ORF がどのように決められているかについて論文調査を行った。Saitら(Journal of general Virology (2011), 92, 1733)は最初に分離されたクラミジアファージ CHP1 の遺伝子配列から推定された ORF の情報を利用してその後分離されたクラミジアファージについて ORF を新たに推定した(図1)。

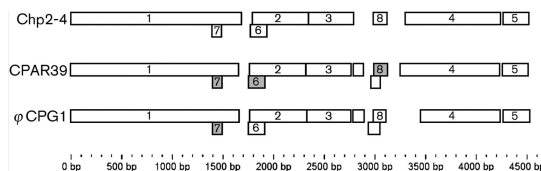


図1 クラミジアファージにおけるORFの配置

Saitら, Journal of general Virology (2011), 92, 1733から引用

この ORF の配置は Genbank において推定されている ORF の配置とは異なっているため、GenBank における ORF の推定が組み換えクラミジアファージを作製するためには適正なタンパク質とはならない ORF が生じる結果となる可能性が考えられた。

また、現在までにクラミジアファージゲノムの複製について明らかになっている点はなく、他のウイルス等の情報、例えば構造の似ているφX174 のウイルス粒子形成機構で得られた情報を利用するしかない。仮にクラミジアファージ phiCPAR39 のファージ粒子形成過程がφX174 と同様であるとすると、ファージ粒子形成に必要なタンパク質(ORF1 から 6 が該当すると思われる)の発現と同時に ORF7 による二本鎖ゲノムの一本化が同時に起こり、一本化したファージゲノムに他のファージタンパク質が結合しながらファージ粒子が形成されることとが推定される。このため、まずは ORF7 を単独で組み換えタ

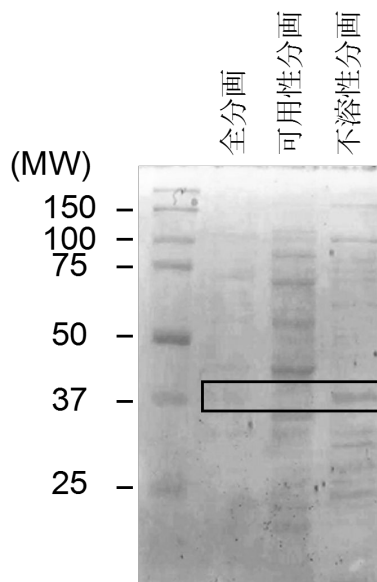


図2. ORF7 のタンパク質発現
 ンパク質として得、ファージゲノムの複製開始点を特定したのちに、新たに組み換えファージ作製に応用することを想定し、いくつかのタンパク質発現系によって ORF7 を発現

させたが、図2に示したように ORF7 は不溶性分画に回収された。この状況についてもいくつかのタンパク質発現系を用いたがタンパク質の不溶化が解消されることはなかった。

(3) 新たな方向性の検討

上記のように、本研究の研究期間内には本研究の目的を達成することはできなかったが、本研究の目的が達成されたとするとこれまで不明であった点が解消されることが期待される。このことから、本研究期間内には検討できなかったが検討するべき点を以下に挙げたい。

まずは、タンパク質発現についてはクラミジアファージ phiCPAR39 のゲノム全体を一つの ORF とみなして大腸菌の発現系に導入することである。この場合にはどの ORF から発現させるかについて検討することが必要だが、ゲノムのどの部位がどの ORF に対応するかについて考慮する必要がなくなる可能性が高い。もう1点は本研究で作製したシャトルベクターを直接肺炎クラミジアの形質転換に用いるというものである。肺炎クラミジアはクラミジアトラコマティスと比較した際に、概して弱くエレクトロポレーションによる形質転換には向かないと考えられている。しかしながら、菌体にダメージをあまり与えないエレクトロポレーションの装置もあることから、これらの装置を用い形質転換できれば将来的な肺炎クラミジアの遺伝子操作に道をつなげることができるかもしれない。

いずれにしてもさらなる検討を行うことが必要である。

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)

[雑誌論文](計6件)

Nakama R, Shingaki A, Miyazato H, Higa R, Nagamoto C, Hamamoto K, Ueda S, Hachiman T, Touma Y, Miyagi K, Kawahara R, Toyosato T, Hirai I: Current status of extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* in Okinawa prefecture, Japan. *J Infect Chemother.* 2016, 22(5):281-286、[査読あり](#)

DOI: 10.1016/j.jiac.2016.01.008

Hamamoto K, Ueda S, Toyosato T, Yamamoto Y, Hirai I: High prevalence of chromosomal $bla_{CTX-M-14}$ in *Escherichia coli* isolates possessing $bla_{CTX-M-14}$. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016, 60(4):2582-2584、[査読あり](#)

DOI: 10.1128/AAC.00108-16

Bui TM, Hirai I, Ueda S, Bui TK, Hamamoto K, Toyosato T, Le DT, Yamamoto Y: Characterization of *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase carriage in healthy Vietnamese individuals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015, 59(10), 6611-6614、[査読あり](#)

DOI: 10.1128/AAC.00776-15

Le QP, Ueda S, Nguyen TN, Dao TV, Hoang TA, Tran TT, Hirai I, Nakayama T, Kawahara R, Do TH, Vien QM, Yamamoto Y: Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Retail Meats and Shrimp at a Local Market in Vietnam. *Foodborne Pathog Dis.* 2015, 12(8):719-725、[査読あり](#)

DOI: 10.1089/fpd.2015

Hamamoto K, Ueda S, Yamamoto Y, Hirai I: Evaluation of three-marker GIG-EM phylogenetic typing of *Escherichia coli* isolates of various genetic backgrounds. *J Clin Microbiol.* 2015, 53(6):1848-1853、[査読あり](#)

DOI: 10.1128/JCM.00227-15

Ueda S, Bui TK, Bui TM, Hirai I, Le DT, Yamamoto Y: Limited transmission of $bla_{CTX-M-9}$ -type positive *Escherichia coli* between humans and poultry in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015, 59(6):3574-3577、[査読あり](#)

DOI: 10.1128/AAC.00517-15

[学会発表](計7件)

平井 到、山本容正：都市レベルでの病原細菌の伝播と循環、第89回日本細菌学会総会、平成28年3月25日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

宮城和文、平井 到：沖縄県内の環境水からの AmpC 及び MBL 産生菌の分離、第89回日本細菌学会総会、平成28年3月24日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

浜元宏太、平井 到：CTX-M 型基質拡張型ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* における染色体性 $bla_{CTX-M-14}$ 遺伝子の高頻度な検出、第89回日本細菌学会総会、平成28年3月24日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

浜元宏太、宮城和文、山本容正、平井 到：GIG-EM 法を用いた利尿分離 *Escherichia coli* 株の系統分離の試み、第88回日本細菌学会総会、平成27年3月26日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

宮城和文、平井 到：沖縄県内の環境水中の ESBL 産生菌の分布と衛生指標菌との関連、第 88 回日本細菌学会総会、平成 27 年 3 月 26 日、長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）

上田宗平、平井 到、山本容正：Limited transmission of CTX-M-9-type ESBL-producing *Escherichia coli* between human and poultry、第 88 回日本細菌学会総会、平成 27 年 3 月 27 日、長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）

平井 到、上田宗平、山本容正：健常人における CTX-M 型基質特異性拡張型 ラクタマーゼ産生大腸菌の動態、第 88 回日本細菌学会総会、平成 27 年 3 月 27 日、長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔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