

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15135

研究課題名(和文) クラミジア増殖におけるCaspase-9とApaf-1の全く異なる作用機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of Caspase-9 and Apaf-1 functions on Chlamydial infection

研究代表者

東 慶直 (AZUMA, Yoshinao)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：90333509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎クラミジアは肺炎の原因となる絶対細胞内寄生性細菌で、その慢性感染は動脈硬化の原因ともなる。クラミジアによる慢性感染の理解には、宿主アポトーシスの制御など、クラミジアの分子感染機構の解明が必須である。本研究計画者は、これまでに肺炎クラミジアのゲノム情報解析を基盤として、クラミジア感染におけるクラミジアの遺伝子と宿主遺伝子の発現解析、クラミジアによる宿主アポトーシスの制御に関する解析を進めてきた。その中で、クラミジアが宿主Caspase-9の封入体の内部への取り込みと活性化に関与する遺伝子の同定に成功し、クラミジア感染への影響を解析している。

研究成果の概要(英文)：Chlamydia is an obligate intracellular bacterial pathogen that replicates solely within a membrane-bound vacuole termed an inclusion. Chlamydia seems to perturb multiple cellular processes of the host, such as, rearrangement of the membrane trafficking system for its intracellular multiplication, and inhibition of host cell apoptosis for persistent infection. In an attempt to clarify host factor involvement in apoptosis regulation, we found that inhibition of Caspase-9 restricted, while Apaf-1 promoted, Chlamydia pneumoniae infection. These opposite contributions were confirmed using caspase-9^{-/-} and apaf-1^{-/-} MEFs. Interestingly, caspase-9 in apaf-1^{-/-} MEFs was activated by chlamydial infection but during the infection caspase-3 was not activated. Moreover the activated caspase-9 was observed within chlamydial inclusions. The sequestration of caspase-9 by chlamydia seems to result in apoptosis repression.

研究分野：微生物ゲノム解析

キーワード：肺炎クラミジア Caspase-9 アポトーシス Apaf-1 NODファミリー 酵母2-ハイブリッド 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

肺炎クラミジアは偏性細胞内寄生性細菌で、流行性の風邪や小児における肺炎の原因となる。さらに、その慢性感染は虚血性心疾患などの基礎疾患となる動脈硬化の発症・悪化の原因ともなる。しかし、慢性感染した肺炎クラミジアに有効な抗生剤は存在せず、抗生剤投与による虚血性心疾患の再発防止の研究では有効性が確認されなかった。一方で、クラミジアによる慢性感染にはクラミジアによる宿主のアポトーシス制御が重要であることが示され、その制御を受ける宿主のアポトーシス因子に関する多くの報告がなされている。しかし、その制御を実行するクラミジア因子についての報告はほとんどなく、さらにクラミジアが宿主のアポトーシスを制御する実際の意味も不明のままである。

本研究計画者は、これまでに肺炎クラミジアのゲノム情報解析を基盤として、クラミジア感染におけるクラミジアの遺伝子と宿主遺伝子の発現解析、クラミジアによる宿主アポトーシスの制御に関する解析を進めてきた。この中で、アポトーシスのミトコンドリア経路における重要な複合体であるアポトソームを構成する Apaf-1 と Caspase-9 のうち、Apaf-1 がクラミジアの増殖を抑制すること、逆に Caspase-9 が Apaf-1 非依存的にクラミジアによって活性化され、活性化された Caspase-9 がクラミジアの感染・増殖を促進することを見出した。

2. 研究の目的

肺炎クラミジアは偏性細胞内寄生性細菌で、流行性の風邪や小児における肺炎の原因となる。さらに、その慢性感染は虚血性心疾患などの基礎疾患となる動脈硬化の発症・悪化の原因ともなる。この慢性感染にはクラミジアによる宿主アポトーシスの制御が重要であることが分かってきているが、その制御に係わるクラミジア因子はまだ全く分かっていない。我々の解析では、クラミジアがアポトーシス関連因子を自らの感染・増殖に利用していること、それゆえ間接的にアポトーシスが抑制することが分かってきた。このクラミジアとアポトーシス因子の相互作用における分子機序を正確に理解し、将来的にクラミジアの慢性感染を抑制する方法の確立に発展させるため、本研究申請を行う。

本研究計画では、まず、クラミジアが Caspase-9 を Apaf-1 非依存的に活性化する機構について、まず、Caspase-9 の活性化に関与するクラミジア因子の同定を試みる。さらに活性化された Caspase-9 がクラミジアの感染・増殖のどのステージおよび因子に作用しているのか明らかにする。一方で、Apaf-1 によるクラミジア感染阻害が、

Caspase-9 をクラミジアに搾取されないようにする間接的な効果なのか、それとも他の NOD ファミリーと同様に Apaf-1 がクラミジアを直接認識しその感染増殖を阻害するのか明らかにする。Apaf-1 が直接クラミジアに作用する場合、それが認識するクラミジア因子を同定し、その相互作用を詳細に解明する。さらに、多くの遺伝子破壊細胞をクラミジア感染に利用することにより、クラミジアが要求する宿主因子を明らかにし、クラミジアの慢性感染を克服する手立てを提案したい。

これまでに我々の解析から、クラミジアが感染と増殖のために宿主の Caspase-9 を搾取し利用することが明らかとなった。そしてその Caspase-9 の搾取が結果として、宿主のアポトーシスが制御される。これは、これまでのクラミジアの宿主制御の発想を一転させるものである。また、これまでアポトーシス促進因子としての機能が広く知られている Apaf-1 が、部分的ドメインを共有する NOD と同様に細胞内における侵入性因子の認識に関与することを示すことになり、新たな Apaf-1 の機能の発見となる。さらに、Caspase-9 や Apaf-1 と相互作用するクラミジア因子の理解は、新たな作用機序を持つ抗クラミジア薬の開発に繋がることが期待できる。

3. 研究の方法

アポトーシス因子の機能に関しての全く新しい知見

アポトーシスの研究における常識として、もしくは生物学の教科書にも記載されることとして、ミトコンドリアからリークするチトクローム *c* が Apaf-1 および Caspase-9 と複合体を形成し、Caspase-9 の活性化が起こることで、アポトーシスに進行する一連の Caspase の活性化が引き起こされる。しかし、本研究計画にあるように、もし Apaf-1 が特異的なクラミジア因子を認識し、その感染・増殖を阻害しているとする、単にアポトーシスの開始因子としての Apaf-1 の機能は大きく展開されることになる。よく知られていることだが、細胞内に侵入したウイルスなどの認識及びその増殖阻害に関与する NOD ファミリーに Apaf-1 が属することからも、Apaf-1 にクラミジア因子の認識機能が備わっていても特に大きな不思議ではない。しかし、Apaf-1 による感染抑制としては、はじめての発見になる。

一方、Caspase-9 はクラミジア感染によって Apaf-1 非依存的に活性化されることが分かった。そして活性化された Caspase-9 はクラミジアが増殖するための封入体に同居する。つまり、Caspase-9 はクラミジアにより活性化されるが、Caspase-3 を活性化することはなく、結果としてアポトーシスが

阻害されることを示す結果を得ている。多くの病原性微生物の解析がなされてきたが、Caspase-9 を搾取することにより自己の増殖を実行する例は過去にない。また、この Caspase-9 の活性化に係わるクラミジア因子もしくは活性化した Caspase-9 によって影響を受けるクラミジア因子の同定が計画通り成功した場合、その相互作用もしくはそれらのクラミジア因子は、全く新規の抗クラミジア薬の開発に大きな知見を与えらる。これがクラミジアの慢性感染を抑制し、動脈硬化の進行を抑制するような医薬品の開発の一助になるよう発展させる。

クラミジアの感染戦略に関する全く新しい知見

クラミジアは偏性細胞内寄生性細菌であり、その遺伝学的・生化学的研究は極めて困難である。本研究申請者はそのゲノム DNA 配列解析およびクラミジアと宿主細胞の遺伝子発現解析からクラミジアの感染戦略の理解を進めてきた。しかし、今回クラミジアが宿主アポトーシス因子である Caspase-9 を利用して感染・増殖を進めるといふ知見は全く新しいものであり、クラミジア研究に大きな発展をもたらす可能性がある。それは、動物細胞で次々とつくり出されている遺伝子破壊細胞を用いて、クラミジアの感染機構を理解しようとする本申請研究により大いに発展すると期待できる。

4. 研究成果

(1) Caspase-9 の機能

我々の研究から、*Apaf-1* 遺伝子破壊マウスから樹立した MEF (*Apaf-1* KO) 細胞においても、クラミジアの感染により Caspase-9 は部分分解され活性化すること、また Caspase-9 活性化阻害剤がクラミジアの感染を阻害することから、クラミジアは独自に Caspase-9 を活性化し、その活性を利用していることが明らかとなった。さらに、この活性化された Caspase-9 はクラミジアの封入体に局在化され、細胞質におけるアポトーシス経路から分離されることから、Caspase-3 の活性化が観察されなかったこと、およびアポトーシスが観察されないことが説明された。

一方、酵母 2-hybrid 法により Caspase-9 と相互作用するクラミジア遺伝子を同定することを目的として、酵母 2-hybrid 法用のクラミジアの全遺伝子ライブラリーを構築した。まず約 1000 の遺伝子に対して 2 対のプライマーを用意し、PCR によって増幅した遺伝子断片をそれぞれ酵母 2-hybrid 法用のベクターに導入した。Caspase-9 を含む酵母 2-hybrid 法用のベクターを導入した酵母に、その約 1000 のクローンベクターを導入することで、酵母 2-hybrid 法を

実施した。相互作用陽性クローンから極めて興味深い遺伝子が同定され、現在そのクラミジア感染における機能および Caspase-9 との関連を解析中である。

(2) アポトーシス関連因子の遺伝子の解析

これまで、クラミジアの感染による宿主アポトーシスの制御は、その感染の慢性化に繋がる重要なイベントとして捉えられ解析がなされてきた。しかし、宿主アポトーシスがクラミジアによる Caspase-9 の搾取による結果だとすると、クラミジアは他のアポトーシス因子も利用している可能性がある。Caspase-8、-3、-6 および一部の IAP はクラミジア感染に影響を与えないことを確認した。現在のところ、クラミジア感染に関与するアポトーシス因子は Caspase-9 と Apaf-1 だけであり、これらの因子の機能バランスによってクラミジアの感染の成功が左右されると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

(1) 東 慶直、ホワイトバイオ発展と発酵微生物の「超」高温耐性化、科学と工業、91(2):48-54、2017 年、査読なし、URL 未

(2) Furuzono T, Okazaki M, Azuma Y, Iwasaki M, Kogai Y, Sawa Y, Newly Developed Biocompatible Material: Dispersible Titanium-Doped Hydroxyapatite Nanoparticles Suitable for Antibacterial Coating on Intravascular Catheters., Contrib Nephrol, 189:144-152, 2017年, 査読あり, DOI:10.1159/000450744

(3) Tsutomu Furuzono, Yoshinano Azuma, Yuichi Niigawa, Yasumichi Kogai, Yoshiki Sawa, Preparation and Characterizations of Dispersible Fluorinated Hydroxyapatite Nanoparticles with Weak Antibacterial Activity, ASAIO Journal, 62(2):197-202, 2016年, 査読あり, DOI:10.1097/MAT.0000000000000322

(4) Kazunobu Matsushita, Yoshinao Azuma, Tomoyuki Kosaka, Toshiharu Yakushi, Hisashi Hoshida, Rinji Akada, Mamoru Yamada, Genomic analyses of thermotolerant microorganisms used for high-temperature fermentations, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 80(4):655-68, 2016年, 査読あり, DOI: 10.1080/09168451.2015.1104235

(5) Furuzono T, Motaharul M, Kogai Y, Azuma Y, Sawa Y, Synthesis and Antibacterial Evaluation of Calcinated Ag-Doped Nano-Hydroxyapatite with

dispersibility., The International journal of artificial organs, 38(5):251-8, 2015年5月, 査読あり,

DOI:10.5301/IJA0.2015.14753

(6) Matsutani M, Ito K, Azuma Y, Ogino H, Shirai M, Yakushi T, Matsushita K, Adaptive mutation related to cellulose

producibility in Komagataeibacter medellinensis (Gluconacetobacter xylinus) NBRC 3288, Applied microbiology and biotechnology, 99:7229-7240, 2015年4月, 査読あり, DOI:10.1007/s00253-015-6598-x

(7) 山田 守、赤田 倫治、高坂 智之、東 慶直、星田 尚司、松下一信、耐熱性発酵微生物の耐熱性を賦与する分子機構、化学と生物、53(11):763-773、2015年、査読あり、URL: https://katosei.jsbba.or.jp/index.php?id=474&back_bn_show=107&bt=on

(8) Mohd. Akhlakur Rahman, Mutsunori Shirai, MD Abdul Aziz, Rie Ushirokita, Sayuri Kubota, Harumi Suzuki, Yoshinao Azuma, An epistatic effect of *apaf-1* and *caspase-9* on chlamydial infection, Apoptosis., 20(10):1271-1280, 2015年, 査読あり, DOI: 10.1007/s10495-015-1161-x

(9) Mikihiko Kawai, Norie Higashiura, Kimie Hayasaki, Naruhei Okamoto, Akiko Takami, Hideki Hirakawa, Kazunobu Matsushita, Yoshinao Azuma, Complete genome and gene expression analyses of *Asaia bogorensis* reveal unique response to culture with mammalian cells as a potential opportunistic human pathogen, DNA Research, 22(5):357-66, 2015年, 査読あり, DOI: 10.1093/dnares/dsv018

〔学会発表〕(計 28 件)

(1) 植田 翔、黒川 亜美、榎本 純、東 慶直、早川 徹、武部 聡、*Bacillus thuringiensis* TK-E6株由来のCry46Abの殺ポウフラ活性、第61回日本応用動物昆虫学会大会、東京農工大学、東京都小金井市、2017年3月28日

(2) 尼子 克己、大倉 未奈子、竹澤 有美、東 慶直、田中 克典、分裂酵母 D-アラビノース脱水素酵素のスクリーニング、日本農芸化学会2017年度大会、京都女子大、京都府京都市、2017年3月18日

(3) 岡崎 正俊、東 慶直、古菌 勉、分散性チタン含有HApナノ粒子の材料特性および抗菌性評価、第20回生体関連セラミックス討論、大阪大学、大阪府吹田市、2016年12月2日

(4) 行徳 宏樹、東 慶直、古菌 勉、微弱な抗菌性を有するフッ素含有HApナノ粒子の調製と材料特性評価、第20回生体関連セラミッ

クス討論、大阪大学、大阪府吹田市、2016年12月2日

(5) 東 慶直、耐熱性酢酸菌を育種によって「超」高温耐性化し、その遺伝的背景を明らかにする。第182回近畿作物・育種研究会、近畿大学生物理工学部、和歌山県紀の川市、2016年11月26日

(6) 行徳 宏樹、東 慶直、古菌 勉、微弱な抗菌性を有する長期留置型カテーテルコーティング材の開発、第54回日本人工臓器学会大会、米子コンベンションセンター(BiG SHiP)、米子市文化ホール、鳥取県米子市、2016年11月24日

(7) 岡崎 正俊、東 慶直、古菌 勉、外部刺激に应答する抗菌性制御型ナノ複合カテーテルの開発、第54回日本人工臓器学会大会、米子コンベンションセンター(BiG SHiP)、米子市文化ホール、鳥取県米子市、2016年11月24日

(8) 岡田 将典、東 慶直、田口 哲志、古菌 勉、椎体圧迫骨折の新規治療法に寄与するナノ材料の開発、第54回日本人工臓器学会大会、米子コンベンションセンター(BiG SHiP)、米子市文化ホール、鳥取県米子市、2016年11月24日

(9) 塩村 紗奈、早崎 君江、則行 紫萌、中菌 沙也佳、山田 知宏、東 慶直、酢酸菌のストレス耐性化のための遺伝子同定及び物質生産への利用、第8回酢酸菌研究会、近畿大学生物理工学部、和歌山県紀の川市、2016年11月5日

(10) 新川 悠一、阿部 恭子、半田 瞳、武井 靖子、東 慶直、*Pseudogluconobacter saccharoketogenes* を用いたグルカル酸合成の試み、第8回酢酸菌研究会、近畿大学生物理工学部、和歌山県紀の川市、2016年11月5日

(11) 新川 悠一、阿部 恭子、半田 瞳、武井 靖子、東 慶直、*Pseudogluconobacter saccharoketogenes* の変異株を用いたグルカル酸合成の試み、第27回大学間交流会、鳥取県立大山青年の家、鳥取県西伯郡大山町、2016年10月8日

(12) MD Abdul Aziz, Rie Ushirokita, Yasuko Takei, Yoshinao Azuma, Study of the role of host apoptotic factor Caspase-9 in the regulation of intracellular Chlamydia infection, 第27回大学間交流会、鳥取県立大山青年の家、鳥取県西伯郡大山町、2016年10月8日

(13) 塩村 紗奈、早崎 君江、則行 紫萌、西川 遥香、伊藤 佑夏、壺内 宏信、東 慶直、酢酸菌のストレス耐性化のための遺伝子同定及び物質生産への利用、第27回大学間交流会、鳥取県立大山青年の家、鳥取県西伯郡大山町、2016年10月8日

(14) 後北 理絵、東 慶直、宿主アポトーシス因子Caspase-9と相互作用を示すクラミジアタンパク質の探索、第27回大学間交流会、鳥取県立大山青年の家、鳥取県西伯郡大山町、2016年10月8日

(15) 辻 彩花、木地 翼、半田 瞳、東 慶直、梅加工場排水処理施設の廃液からの菌の単離、第27回大学間交流会、鳥取県立大山青年の家、鳥取県西伯郡大山町、2016年10月8日

(16) 岡田 香保、早崎 君江、櫛谷 綾香、東 慶直、アブラナ科野菜に特異的に感染する根コブ病菌 (*Plasmodiophora brassicae*) の感染機構理解に向けた試験管内感染実験系の構築、第27回大学間交流会、鳥取県立大山青年の家、鳥取県西伯郡大山町、2016年10月8日

(17) 新川 悠一、阿部 恭子、半田 瞳、武井 靖子、東 慶直、*Pseudogluconobacter saccharoketogenes* の変異株を用いたグルカル酸合成の試み、平成28年度先端技術総合研究所オープンポスターセッション、近畿大学先端技術総合研究所、和歌山県海南市、2016年10月2日

(18) Sho Ueda, Ayako Negoro, Masatoshi Ota, Ami Kurokawa, Jun Makimoto, Yoshinao Azuma, Tohru Hayakawa, So Takebe, Mosquitocidal activity of non-3-domain Cry type 33-kDa protein from *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan, SIP Annual Meeting 2016, Vinci Centre International de Congrès de Tours, Tours, France, 2016年7月27日

(19) 波多野 裕美、武部 聡、松下一信、東 慶直、Omics analyses for Hyper Glucose-Tolerance using Acetic Acid Bacteria, Metabolic Engineering 11, Awaji Yumebutai International Conference Center, 兵庫県淡路市、2016年6月28日

(20) Ayaka Tsuji, Sayaka Nakazono, Kaho Kuramoto, Naruhei Okamoto, Yasuko Takei, Yuichi Niigawa, Taku Nishimura, Isao Matsushita, Jun Tsubota, Yoshikazu Kawata, Takaaki Kiryu, Taro Kiso, Hiromi Murakami, Kazunobu Matsushita, Yoshinao Azuma, Pyruvic acid production using thermotolerant *Halomonas* sp. KM-1, Metabolic Engineering 11, Awaji Yumebutai International Conference Center, 兵庫県淡路市、2016年6月27日

(21) 波多野 裕美、岡本 成平、武部 聡、松下一信、東 慶直、Molecular Engagements for Hyper Glucose-Tolerance of Acetic Acid Bacteria, *Tanticharoenia sakaeratensis* and *Asaia bogorensis*, the ASM Microbe 2016, Boston Convention and Exhibition Center, Boston, America, 2016年6月18日

(22) 岡本 成平、中園 沙也佳、武井 靖子、倉本 華歩、辻 彩花、新川 悠一、西村 拓、

松下 功、坪田 潤、河田 悦和、東 慶直、*Halomonas* sp. KM-1とその変異体を用いたピルビン酸生産の検討、日本農芸化学会2016年度大会シンポジウム、札幌市教育文化会館、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市、2016年3月28日

(23) MD Abdul Aziz、後北 理絵、東 慶直、Elucidation of the role of host apoptotic factor Apaf-1 and Caspase-9 in the regulation of intracellular *Chlamydia* infection、第26回大学間交流会、ツネイシしまなみビレッジ、広島県福山市、2015年9月26日

(24) 早崎 君江、川田 愛美、岡田 香保、武部 聡、東 慶直、根こぶ病菌 *Plasmodiophora brassicae* の試験管内実験系の確立に向けた菌株のクローニングとハクサイのカルス・発根系の構築、第26回大学間交流会、ツネイシしまなみビレッジ、広島県福山市、2015年9月26日

(25) 新川 悠一、武井 靖子、東 慶直、*Pseudogluconobacter saccharoketogenes* を用いたグルカル酸合成の試み、第26回大学間交流会、ツネイシしまなみビレッジ、広島県福山市、2015年9月26日

(26) 塩村 紗奈、早崎 君江、則行 紫萌、中園 沙也佳、山田 知宏、東 慶直、酢酸菌のストレス耐性化のための遺伝子同定及び物質生産への利用、第26回大学間交流会、ツネイシしまなみビレッジ、広島県福山市、2015年9月26日

(27) 樋口 みのり、MD Abdul Aziz、後北 理絵、東 慶直、一般的な抗生剤とは全く異なる物質を用いての肺炎クラミジア感染抑制方法の試み、第26回大学間交流会、ツネイシしまなみビレッジ、広島県福山市、2015年9月26日

(28) MD Abdul Aziz、東 慶直、Elucidation of the role of host apoptotic factor Apaf-1 and Caspase-9 in the regulation of intracellular *Chlamydia* infection、近畿大学サイエンスネットワーク2015 第5回院生サミット、近畿大学生物理工学部、和歌山県紀の川市、2015年7月11日

〔その他〕

<http://azuma99.wixsite.com/author-blog/blank-wkpob>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 慶直 (AZUMA, Yoshinao)
近畿大学・生物理工学部・准教授
研究者番号：90333509

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

- ・ MD Abdul Aziz (MD Abdul Aziz)
- ・ 早崎君江 (HAYASAKI, Kimie)
- ・ 新川悠一 (NIIGAWA, Yuichi)
- ・ 塩村紗奈 (SHIOMURA, Sana)
- ・ 後北理絵 (USHIROKITA, Rie)