

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：33705

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07312

研究課題名(和文) 性器クラミジアIII型分泌エフェクターの効率的発現システム構築と病態形成機構解析

研究課題名(英文) Investigation of chlamydial pathological mechanism by using establishment of a system for expressing chlamydial type III effector proteins

研究代表者

山崎 智弘 (Yamazaki, Tomohiro)

東海学院大学・健康福祉学部・講師(移行)

研究者番号：10784829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、クラミジアタンパク質発現を、従来の大腸菌を用いた方法ではなく、Brevibacillus分泌発現システムにより導入し、効率的な発現系を確立するために研究を進めようと試みた。性器クラミジアの近縁種で取り扱いが容易なパラクラミジアのタンパク質をBrevibacillus分泌発現システムを用いて発現させるべく実験を進めたが、タンパク質を発現させるまでには至らなかった。クラミジアタンパク質をコードする特徴と大腸菌やBrevibacillusの特徴が異なる可能性があるかなどについて検討していく必要があるが、クラミジアタンパク質発現が困難なことが再確認され、今後のクラミジア研究の一助になった。

研究成果の概要(英文)：Usual chlamydial protein expression system is expressing in E. coli, but it is not very efficiently. So, I challenged to establishing of an expression system by using Brevibacillus Expression System II. Parachlamydia acanthamoeba was used in the experiment, it is easy to handling and closely related species for Chlamydia trachomatis that is the serious issue of a cause of sexually transmitted disease. Consequently, chlamydial proteins was not expressed by using this system in this time. It may be necessary to compare the difference of characteristics of the gene sequence encoding amino acids between Chlamydia, E. coli and Brevibacillus, and so on, but this research is thought to be a help for chlamydial research in the future.

研究分野：細菌学

キーワード：Chlamydia Parachlamydia

1. 研究開始当初の背景

(1) 性感染症の主要原因：クラミジア

性感染症の主要な原因微生物は、細胞内寄生性という人工の培地で培養できない特殊な性質を持つ細菌の性器クラミジア (*Chlamydia trachomatis*) であり、世界的に見ると年間約 500 万人程度の人が新たに感染している普遍的な感染症である (Horner ら *Sex Transm Infect* 2006)。わが国でも、厚生労働省の報告によると、性器クラミジア感染症は年間 2 万~3 万人が罹患しており、性感染症全体の中で最も報告数の多い感染症である。性器クラミジア感染症は、感染者の多くが無症候性であり、治療の遅延により症状が悪化し、骨盤内炎症性疾患 (PID) や不妊の原因となる (Lusk ら *Curr Opin Infect Dis* 2008)。また抗菌薬治療後の再発も高頻度に見られるのも特徴といえる (Gallegos ら *Fertil Steril* 2008)。

(2) 偏性細胞内寄生性という特殊な特徴

上記のように性器クラミジアは感染者も多く、性感染症として、世界的な問題となっているため、性器クラミジア感染症を的確に捉えコントロールする根本治療法を見いだすべく研究が行われている。しかしながら、クラミジアは偏性細胞内寄生性という特殊な性質を持ち、大腸菌や黄色ブドウ球菌などのように人工培地で増殖させることができず、増殖培養して実験に使用するためには、培養細胞などが必要となる。そのため、性器クラミジアの研究は、細胞内生存様式や細胞修飾機構の解明を目指したものが中心に行われてきた。

(3) 性器クラミジアと他細菌の混合感染

性感染症を起こす性器クラミジアが主として感染する腔粘膜面では、多数の常在細菌や種々の微生物が存在し、相互に関係しあうことで、性器クラミジアの病態形成機構を複雑化していると考えられている。

現在、性器クラミジアに対する主要な生体内防御因子としてインターフェロン- γ (IFN- γ) の存在が知られており、インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) の働きによって、感染細胞内のクラミジアの発育に必要な栄養素であるトリプトファンが枯渇がクラミジア防御の主な要因であると考えられている (Bernstein-Hanley ら *PNAS* 2006; Al-Zeer MA ら *PLoS ONE* 2009)。それ故に、生殖器粘膜において、IFN- γ から、クラミジアはエスケープする機構を適応進化させている可能性があり、IFN- γ によって一旦修飾を受けたクラミジア菌体エフェクターが、他の同時に混在する細菌との相互作用を介して機能回復を果たしているということは、極めて有力な生存戦略といえる。実際、性器クラミジアが感染する女性生殖器粘膜には、ウレアプラズマ (*Ureaplasma parvum*) など他の性感染症起因菌が同時に感染する

リスクがあると指摘されており、混合感染による相互作用が性器クラミジアの無症候化や再発さらに症状の顕性化にも密接に関係している可能性も考えられる。しかしながら、実態調査を含め混合感染という側面からの性器クラミジアの細胞内機能修飾機構を紐解いた研究は皆無であった。そこで、我々は、札幌の市中病院における健常妊婦の膣スワブを回収し、性器クラミジアとウレアプラズマの混合感染頻度を検討し、これら 2 つの菌種が同一患者腔環境中に同時に存在する確率が有意に高いことを明らかにした。(Yamazaki ら *BMC Infectious Disease* 2012) さらに、*In vitro* にて HeLa 細胞に感染した性器クラミジアにウレアプラズマを人為的に混合感染させると、生体内主要防御因子とされる IFN- γ の存在下で抑制された性器クラミジアの増殖能が部分的に回復することを明らかにし、この現象が IDO の発現とは無関係に起こっていることも併せて発見、報告した。(Yamazaki ら *Journal of Infection and Chemotherapy* 2014)

(4) エフェクタータンパク質の役割

混合感染時のクラミジア増殖能の変化には、ウレアプラズマによる直接的な影響も否定できないが、偏性細胞内寄生性細菌であるクラミジアの細胞修飾機構が密接に関係していると考えられる。偏性細胞内寄生性細菌である性器クラミジアは、宿主細胞への侵入や封入体の形成、菌体内で生合成できない栄養の奪取や免疫機構からの回避など、宿主細胞環境をクラミジアの発育に適した状態へと調節するために III 型分泌装置から分泌される様々なエフェクタータンパク質を利用している。

現在までに、III 型分泌装置の構造を形作るタンパク質をクラミジアが保存していることが明らかになっている (Peters J ら *Trends Microbiol* 2007; Valdivia RH ら *Curr Opin Microbiol* 2008)。III 型分泌装置は針状構造をとり、宿主細胞膜を貫通して直接エフェクタータンパク質を感染細胞内へ分泌し、感染宿主細胞の標的分子の修飾により、クラミジアの生存に適した状態へと作り変えている。中でも、機能の研究が最もよく進んでいるエフェクターは TARP (translocated actin-recruiting phosphoprotein) であり、クラミジアが宿主細胞膜に付着した際に細胞質へと打ち込まれ、宿主細胞質アクチンのリン酸化により重合を促進し、細胞骨格を作り変えて上皮細胞へ侵入しやすくしていることが知られている (Mueller KE ら *Infect Immun* 2014)。性器クラミジアは、エフェクタータンパク質を巧みに利用し、細胞内増殖を促進することがこれまで明らかになってきた。しかしながら、現在同定されているクラミジアのエフェクターは限られており、クラミジアの細胞内生存戦略についての全貌は解明されていない。

(5) 未知のエフェクタータンパク質の同定
我々は既知のクラミジアゲノム情報を基に、コンピューター上でIII型分泌装置エフェクター推定ソフトウェアを用いて、クラミジアの新規エフェクター候補遺伝子の推定を行い、ゲノムアノテーションによって機能予測した。しかし、クラミジア新規エフェクター候補遺伝子の多くは機能未知の仮想タンパク質であり、更なる機能解析を必要としたため、大腸菌への遺伝子導入を行いタンパク質の合成を試みた。しかしながら、ほとんどのタンパク質が不溶性分画に誘導されてしまい、発現条件を変えてもうまくいかず、その後の解析実験に進むことができなかった。さらに、機能がある程度わかっているタンパク質についても同様に十分なタンパク質を得ることができなかった。そこで、本研究では、性器クラミジアの細胞内生存戦略の更なる理解のために、細胞修飾機構を担うクラミジアタンパク質の効率的な取得・解析を目指して実験を行うことにした。

2. 研究の目的

(1) クラミジアタンパク質の効率的な発現システムの確立

背景で述べたように、これまで、クラミジアタンパク質の発現実験の多くは大腸菌を利用した組換え・発現系を用いたものであった。しかしながら、クラミジアタンパク質の多くは宿主である大腸菌との組換え時の相性が悪く、可溶性分画に発現されるタンパク質はごく一部であり、クラミジアのタンパク質解析を用いた病原体形成機構研究の障害となっていた。そこで本研究では、以前の研究でIII型分泌エフェクターの候補として得られたタンパク質の発現遺伝子をプレバチルス分泌発現システムにより導入し、大腸菌を用いた従来のクラミジアタンパク質発現系と比較して、効率的な発現の確立を目指す。

(2) エフェクター候補タンパク質の病態形成機構への役割の検討

以前の研究でクラミジアの新規エフェクタータンパク質候補として挙げられたタンパク質が、クラミジアの感染や宿主細胞の増殖などにどのような影響を与えているのかを解明し、クラミジアの細胞内生存戦略のさらなる理解の一助にしたい。

(3) 性器クラミジア感染症の拡大に対する新規防御手段の考察

クラミジアの病態形成機構において、クラミジアが産生、分泌するエフェクタータンパク質が重要な役割を担っている可能性が高いことは、これまでの研究から明らかになってきている。そのため、効率的なタンパク質発現系の確立は、クラミジアタンパク質の研究を進めていくうえで必要不可欠なものであり、効率的なタンパク質発現系によって、クラミジアタンパク質の研究が進めば、世界

的に感染者の多い性器クラミジア感染症の感染拡大を防ぐ新たな方法の開発につながるものと思われる。

3. 研究の方法

(1) クラミジアタンパク質の効率的な発現システムの確立

性器クラミジアのタンパク質の効率的な発現システムの構築を目指して、性器クラミジアのタンパク質を *Brevibacillus Expression System II* (Takara-bio, Shiga, Japan) を用いて導入し、発現させる。*Brevibacillus* を用いた遺伝子導入発現法は、特に高効率分泌発現を特徴とするタンパク質生産性能に優れたシステムであり、エフェクタータンパク質などの活性型を有するタンパク質の可溶性分画への分泌発現に適しているとされる方法である。(Yamagata H ら *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, Tojo H ら *J Biotechnol* 1994)

コントロールとして、以前我々が試みた方法である *E. coli* BL21 と種々のベクターを用いた方法も行い、タンパク質の発現量及び可溶性分画への誘導性を比較検討する。

(2) 新規エフェクタータンパク質候補が細胞に与える影響の検討

エフェクタータンパク質のヒト細胞に与える影響を検討するために、発現されたエフェクタータンパク質をヒト上皮細胞株 HeLa 細胞の培養上清に添加し、HeLa 細胞のアポトーシス誘導能の変化や細胞増殖能の変化を検討する。新規エフェクタータンパク質候補が、細胞に直接的に作用する効果があるのかを調査する。

(3) エフェクター候補タンパク質がクラミジアの増殖に与える影響の検討

クラミジアをヒト上皮細胞株 HeLa 細胞に感染させ、その培養上清にエフェクタータンパク質を加えて、クラミジアの増殖能の変化を検討する。(2)での、エフェクタータンパク質候補のヒト細胞への直接的な作用だけでなく、クラミジアの増殖における間接的で補助的な役割があるのかを調査する。

4. 研究成果

(1) 研究申請当初予期していなかった事象とその対応

本研究計画は、性器クラミジアや HeLa 細胞を用いた実験と、それらの組換え実験のために BSL2 の施設を使用する必要があり、当研究機関には申請時点で BSL2 の施設はなかったが、安全キャビネットを購入することにより実現できると考えていた。しかしながら、採択された際の補助金額と販売価格の変動の観点から、研究を進めるうえで安全キャビネットの購入を断念せざるを得なくなった。そのため、BSL1 施設でも問題なく扱え、性器クラミジアの近縁種であり、以前の研究にも

使用しておりエフェクタータンパク質候補を性器クラミジア同様に調べていた経緯のある、*Parachlamydia acanthamoeba* (以下、パラクラミジア)を用いて研究を進めることにした。直接、性器クラミジアの研究はできなくても、近縁種の性状を調べることによって、似たような働きや配列のタンパク質から間接的に働きを推測することができるのではないかと考え、また取り扱いも性器クラミジアに比べて非常に容易であることから、上記事象も考慮して、パラクラミジアを用いることとした。

(2) 研究の主な成果

パラクラミジアの既知のタンパク質及びエフェクター候補タンパク質を利用した *Brevibacillus* 発現システム系への導入は、結果としてうまく発現させることができなかった。*Brevibacillus* 分泌発現システムにおけるタンパク質導入・発現条件を *Brevibacillus* の培養条件やプラスミドの作成条件などを検討してみたが、現時点で効率的な発現は得られなかった。

(3) 得られた成果の位置づけ、インパクト

これまで、クラミジアタンパク質の効率的な発現は十分に得られてこず、様々な方法が検討されてきた。新しい方法を検討し、うまくいかない方法でも、一つずつ明らかになっていくことで、クラミジアのタンパク質発現が困難であることが再確認されるのと同時に、未挑戦の技術の検討としては微力ながら価値があったように思う。本研究も、明らかになったことは直接的に利用できることではないかもしれないが、今後のクラミジア研究の一助になったと考えられる。

(4) 今後の展望

今回の研究では、*Brevibacillus* 発現系のクラミジアタンパク質の効率的な発現にまでは至らなかったが、その原因はまだわかっていない。*Brevibacillus* 分泌発現システムの培養条件の最適化、培養条件やタンパク質発現条件の検討をさらに進めていく必要がある。*Brevibacillus* 発現系やその他の方法だとしても、感染者数の非常に多い性感染症の原因であるクラミジアのタンパク質の十分な発現とそれを利用したタンパク質解析は必ず必要になる技術であると確信している。

また、現在までの状況として、*Brevibacillus* 分泌発現システムのクラミジアタンパク質への応用が難しい可能性は非常に高いため、大腸菌を用いた分泌発現システムの条件検討や新たなタンパク質発現系の検討も併せて行い、クラミジアタンパク質の実験に使用可能なレベルでの効率的な発現を目指していく必要があるように思う。

結果として、今後の展開への一歩を踏み出す上で非常に意義のある研究だったと考え

ている。

研究者個人としては、研究活動スタート支援として、本研究を社会人1年目に、新しい場所で、一人で一から進めてきたことで、研究代表者として研究を進めていく方法や必要な知識や技術が得られ、研究活動スタート支援の名前の通り、今後の研究活動へのスタートを切る助けになった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 智拓 (YAMAZAKI, Tomohiro)
東海学院大学・管理栄養学科・講師
研究者番号: 10784829