

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07737

研究課題名（和文）クラミジア感染におけるアポトーシス因子Apaf-1とCaspase-9の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of Apaf-1 and Caspase-9 involvement in chlamydial infection

研究代表者

東 慶直（Azuma, Yoshinao）

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：90333509

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：肺炎クラミジアの感染には宿主のアポトーシス促進因子であるApaf-1とCaspase-9が関与する。そのCaspase-9と物理的相互作用するクラミジア因子を探索したところ、グリコーゲンの合成に係わる2遺伝子と外膜タンパク質遺伝子2遺伝子を含む合計5遺伝子が分離された。それらの因子の組換え体タンパク質を合成し、Caspase-9と共沈殿することを確かめた。さらに作成したそれらの因子に対する抗体が肺炎クラミジアの感染を中和することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎クラミジアは流行性の風邪や肺炎の原因であり、その慢性感染は動脈硬化の発症・増悪の原因となる。この慢性感染の成立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示されている。我々は肺炎クラミジアが宿主アポトーシス促進因子であるcaspase-9をその感染・増殖に利用していること、またcaspase-9が肺炎クラミジアのグリコーゲンの合成に係わる因子や外膜タンパク質遺伝子と相互作用することを明らかにした。さらにその因子に対する抗体が肺炎クラミジアの感染を中和することから、クラミジアに起因する肺炎の治療や予防はもとより、動脈硬化症の予防の突破口とすべく研究を進めている。

研究成果の概要（英文）：Infection of *Chlamydia pneumoniae* involves the host proapoptotic factors, Apaf-1 and Caspase-9. As a result of screening of chlamydia factors that physically interact with Caspase-9, total 5 genes including 2 genes involved in glycogen synthesis and 2 outer membrane protein genes were isolated. It was confirmed that recombinant proteins of these factors were co-precipitated with Caspase-9. Furthermore, it was shown that the produced antibodies against these factors can neutralize *Chlamydia pneumoniae* infection.

研究分野：微生物学

キーワード：宿主-寄生体相互作用

ある。

動脈硬化症の発症および悪化の原因となる肺炎クラミジアの感染対策には、極めて特異的な分子進化を有するクラミジアの持続感染機構を理解する必要がある。我々のこれまでの研究から、クラミジア因子とヒト宿主因子の相互作用および形質的な関係を明らかにしてきた (Rahman, Apoptosis. 2015) (図3)。しかし、それはあくまでも点と線といった連携にとどまっている。今回の研究では、クラミジアの封入体構造やクラミジアの封入体内代謝、封入体膜の物質輸送を全面的に理解することを計画する。これらが図式化される時、クラミジアの分子進化の過程が明らかとなり、その持続感染に対する治療手段の開発の方向も示唆できると考える。

3. 研究の方法

(1) Apaf-1、caspase-9 と相互作用するクラミジア因子の酵母 2-hybrid 法に用いた同定

Apaf-1 と Caspase-9 と物理的相互作用するクラミジア因子を明らかにするため、本研究では 2 組の肺炎クラミジア全遺伝子ライブラリーを構築する。1 つ目は酵母 2-hybrid 法に用いるライブラリーで、肺炎クラミジアが有する約 1000 の全遺伝子を個別に酵母ベクターにクローニングする。PCR によって増幅した目的とする DNA 断片と線状化した酵母 2-hybrid 法ベクターを混合し、相同組換えに基づく方法で簡単にクローニングする。現在のところ、クラミジアの遺伝子の中でも重要だと考えられた約 250 遺伝子をクローニングし、それらの酵母内での遺伝子発現を確認した。平成 29 年度中には残り約 750 遺伝子のクローニングを完了する。

得られた肺炎クラミジア全遺伝子ライブラリーに対して、Apaf-1 と Caspase-9 をベイトとして相互作用する遺伝子をスクリーニングする。すでにクローニングした 250 遺伝子からは Caspase-9 をベイトとして 10 遺伝子程度が選抜されていることから、全体では 100 程度の遺伝子が選抜されると見込まれる。それらの遺伝子については Apaf-1 と Caspase-9 のベクターと交換することによって相互作用の確認を行う。

(2) Apaf-1、caspase-9 と相互作用するクラミジア因子のタンパク質アレイによる同定

酵母ベクターへのクローニングに使用したクラミジアの遺伝子を含む DNA 断片を、In vitro 相同組換えに基づくクローニング方法によって大腸菌の発現用 pET ベクターに導入し、肺炎クラミジアの全遺伝子ライブラリーを構築する。大腸菌内での遺伝子発現を行い、部分的に精製した肺炎クラミジアのタンパク質を調製し、肺炎クラミジアのタンパク質アレイを作成する。すでに 20 程度の遺伝子のクローニングし、その遺伝子の発現を確認している。また、ヒト由来の Apaf-1 と Caspase-9 の遺伝子も同様に大腸菌の発現用 pGEX ベクターに導入し、Apaf-1 と Caspase-9 のタンパク質を調製する。その Apaf-1 と Caspase-9 のタンパク質をプローブとして、それぞれが物理的に結合するクラミジアタンパク質を選別する。相互作用が示唆されたタンパク質については、十分な精製を行った上で、Apaf-1 と Caspase-9 と in vitro でプルダウンアッセイなどを実施し、その相互作用を確認する。

一方、この実験では複数の遺伝子からその産物であるタンパク質が調製できないことが予想される。ポジティブとして選抜されるタンパク質が検出されなかった場合には、(1) で示した酵母 2-hybrid 法でポジティブとして選抜された遺伝子について重点を置いてタンパク質の調製を試みる。その場合には、Apaf-1 と Caspase-9 と in vitro プルダウン法などを実施し、その相互作用を確認する。

(3) Apaf-1、caspase-9 とクラミジア因子の実験的相互作用ドメイン解析

Apaf-1 には Caspase をリクルートするドメインである CARD とオリゴマー形成ドメイン NOD、WD40 繰り返し配列 WDRs が存在する。この NOD ドメインの存在によって Apaf-1 は NOD ファミリーに加えられる。また、Caspase-9 は CARD とプロテアーゼドメインから構成される。Apaf-1 と Caspase-9 について、それぞれのデリション変異体を作成し、酵母 2-hybrid 法もしくは in vitro プルダウン法を用いて、相互作用する肺炎クラミジアのタンパク質との相互作用を評価する。逆に肺炎クラミジアのタンパク質について Apaf-1 と Caspase-9 と相互作用するドメインを解析する。

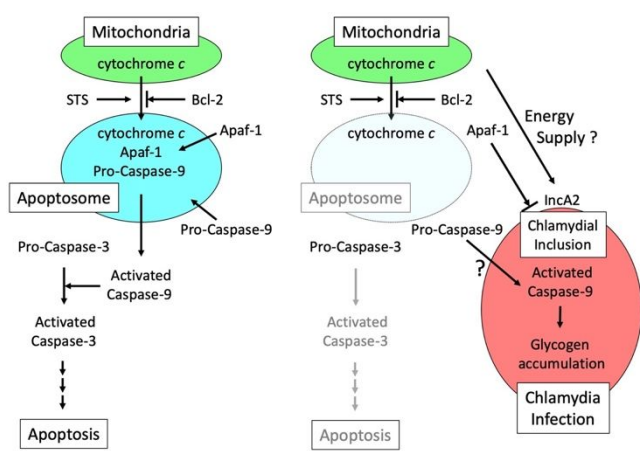


図3) ミトコンドリア経路によるアポトーシス(左)とクラミジア因子とアポトーシス上流因子およびミトコンドリアとの関係(右)

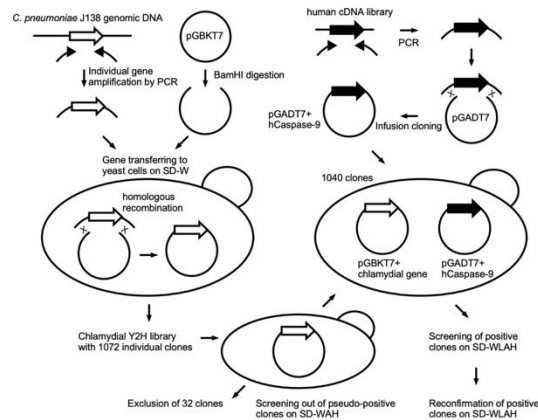


図4) 酵母 2-hybrid を用いた寄生体-宿主相互作用をスクリーニングするための実験系

4. 研究成果

クラミジアの感染戦略を理解するためには、寄生体-宿主の相互作用解析が遺伝子発現解析や代謝解析と連携することが必須である。まず、我々はY2H用の肺炎クラミジアJ138株の全遺伝子のスクリーニング系(図4)とY2H用のヒト全遺伝子のスクリーニング系の作成、高発現量する5種類の封入体膜タンパク質の抗体とCaspase-9と相互作用する因子に対する抗体の作成を実施した。

の実験から、想像を超えた寄生体-宿主相互作用の存在が明らかになった。宿主アポトーシス因子Caspase-9の活性化にはApaf-1が必須であるが、クラミジア感染によってCaspase-9は封入体内で活性化されている。Caspase-9と相互作用する因子としてグリコーゲンの合成に係わる2遺伝子と外膜タンパク質遺伝子2遺伝子を含む合計5遺伝子が分離された(Aziz JGAM. 2018) (図5および未公開データ)。そのCaspase-9と相互作用することが示されたクラミジアの外膜タンパク質2種類は、試験管内の実験においてCaspase-9とそれぞれ共沈殿することが示された。その外膜タンパク質はクラミジア菌体と封入体内を連携するタンパク質であると考えられ、Caspase-9の宿主細胞室からクラミジア封入体への輸送やCaspase-9の活性化と関係することが考えられる。一方、クラミジアは封入体内にグリコーゲンを蓄積することが古くから知られている。しかし、そのグリコーゲンの蓄積と感染の関係は全く報告がない。そこで、Caspase-9と相互作用することが示された5種類のタンパク質についてタンパク質を調製し、抗体を作成した。現在はそれらの抗体を用いて、それらタンパク質の挙動を観察するとともに、感染の阻害に関しても実験を進めている。また、封入体内で活性化したCaspase-9がいずれかのタンパク質を活性化するか検討している。さらに、Apaf-1についても同様の実験を進め、すでに興味深い結果を得ている。その活性化機能としては、2つのグリコーゲン合成因子(PgcAとGlgA)の活性化によるクラミジアの増殖支援であることを示唆するデータを得ている。

肺炎クラミジアは情報解析から25の封入体膜タンパク質遺伝子を保有する。他のクラミジアとは異なり、封入体膜タンパク質遺伝子*incA*に類似する遺伝子である*incA1*と*incA2*をもつ(図6上)。その*incA1*の発現で酵母は増殖を停止し、*incA2*の発現はヒト細胞内でアポトーシスを誘導する(図6下)など真核生物の細胞に強い影響を与える。酵母2-hybrid法(Y2H)によるスクリーニングでは、IncA2と別の封入体膜タンパク質KhcはCaspase-9と相互作用することが明らかになるとともに、それぞれ異なる宿主ミトコンドリアに局在するタンパク質と相互作用することが示された。上記未発表データ。これまでクラミジア封入体とミトコンドリアは感染細胞内での物理的距離が極めて近いことから、エネルギーの搾取としての関係が類推されこともあれば、逆に封入体の巨大化に伴うブルドーザー効果であり代謝的な意味は認められないとするなど様々な推論がなされてきた。我々はY2Hにより示された相互作用をもとに、クラミジア封入体とミトコンドリアの関係を明らかにすることを計画する。方法としては、近年開発されたクラミジアへの遺伝子導入・破壊方法を取り入れ、また宿主細胞の重要遺伝子にはCRISPR-cas9を用いて破壊するなどの遺伝学的手法により、これらの封入体膜タンパク質の機能を明らかにすることを計画する。また、ミトコンドリアの存在しない(-)の細胞も活用する予定である。

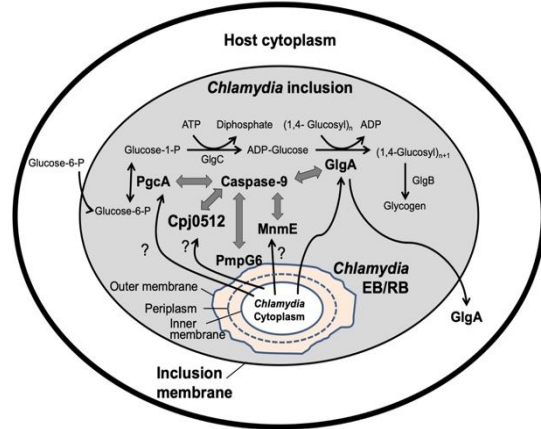


図5) 宿主 Caspase-9 とクラミジアのグリコーゲン合成因子などの相互作用

そのCaspase-9と相互作用することが示されたクラミジアの外膜タンパク質2種類は、試験管内の実験においてCaspase-9とそれぞれ共沈殿することが示された。その外膜タンパク質はクラミジア菌体と封入体内を連携するタンパク質であると考えられ、Caspase-9の宿主細胞室からクラミジア封入体への輸送やCaspase-9の活性化と関係することが考えられる。一方、クラミジアは封入体内にグリコーゲンを蓄積することが古くから知られている。しかし、そのグリコーゲンの蓄積と感染の関係は全く報告がない。そこで、Caspase-9と相互作用することが示された5種類のタンパク質についてタンパク質を調製し、抗体を作成した。現在はそれらの抗体を用いて、それらタンパク質の挙動を観察するとともに、感染の阻害に関しても実験を進めている。また、封入体内で活性化した

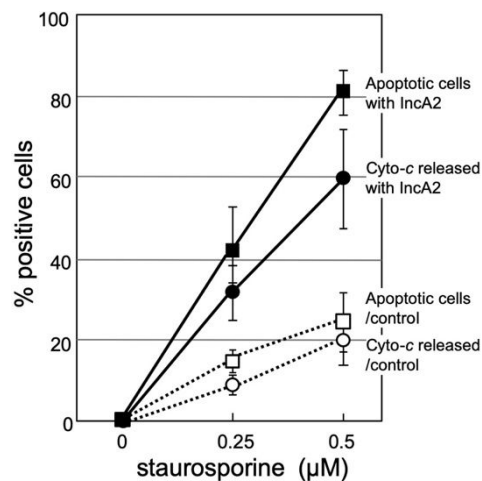
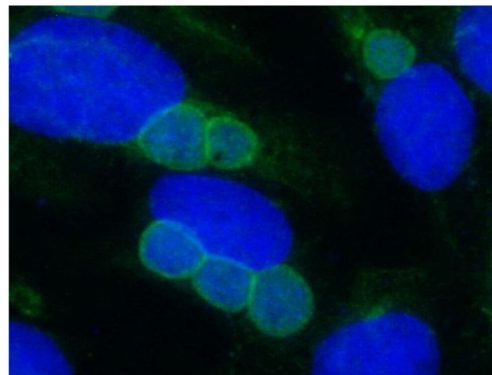


図6 (上図) 抗 IncA2 抗体による感染細胞の染色。緑色の環状に染色されるのが封入体膜で、青色がDNA。(下図) *incA2* を発現させた細胞におけるアポトーシスした細胞□と Cytochrome *c* がミトコンドリアから漏洩した細胞の割合。破線はコントロール。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroki Nishiyama, Tomoyuki Nagai, Masatoshi Kudo, Yoshihisa Okazaki, Yoshinao Azuma, Tomohiro Watanabe, Susumu Goto, Hiroyuki Ogata*, Toshiharu Sakurai	4. 巻 495
2. 論文標題 Supplementation of pancreatic digestive enzymes alters the composition of intestinal microbiota in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 273-279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Md. Abdul Aziz, Rie Ushirokita, and Yoshinao Azuma	4. 巻 64
2. 論文標題 Identification of Chlamydia pneumoniae candidate genes that interact with human apoptotic factor caspase-9.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 253-257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Y. Azuma, M. A. Aziz, Y. Takei, T. Yamate, A. Tsuji, K. Okada
2. 発表標題 Identification of Chlamydial factors interacting with host apoptotic factor Caspase-9
3. 学会等名 ASM Microbe 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Md Abdul Aziz, 武井 靖子、山手 大士、東 慶直
2. 発表標題 肺炎クラミジアの in vitro 感染を促進する宿主アポトーシス因子 caspase-9 が 相互作用するクラミジア因子の同定
3. 学会等名 第36回日本クラミジア研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Md Abdul Aziz*, Rie Ushirokita, Yasuko Takei, Taishi Yamate, Kentaro Ogisu, Yoshinao Azuma
2. 発表標題 STUDY OF THE ROLE OF HOST APOPTOTIC FACTOR CASPASE-9 IN THE REGULATION OF INTRACELLULAR CHLAMYDIA INFECTION
3. 学会等名 IUMS2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshinao Azuma, MD Abdul Aziz, Yasuko Takei, Taishi Yamate, Ayaka Tsuji, Kaho Okada
2. 発表標題 Identification of Chlamydial factors interacting with host apoptotic factor Caspase-9
3. 学会等名 ASM Microb2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 代表：新居 志郎，倉田 毅，林 英生，本田 武司，小田 紘，松本 明（分担：東 慶直）	4. 発行年 2017年
2. 出版社 北大出版	5. 総ページ数 916
3. 書名 病原最近・ウイルス図鑑	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考