

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：37103

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590525

研究課題名(和文) 宿主細胞のアポトーシスを制御する肺炎クラミジア分子の探索

研究課題名(英文) Exploring factors of Chlamydia pneumoniae regulating host apoptosis

研究代表者

三浦 公志郎 (Miura, Koshiro)

九州女子大学・家政学部・教授

研究者番号：30284243

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)：我々は、酵母アポトーシスを抑制するクラミジア遺伝子を得た。しかし再現性が高くなく、これらが本当にアポトーシスを抑制するとの結論に至らなかった。エフェクター遺伝子候補のうち、肺炎クラミジアに特異的なFke034を解析した。この遺伝子をヒト細胞に発現させると細胞膜に局在し、アポトーシスを促進した。Fke034の中央部が細胞膜への局在に必要かつ十分で、C末端はヒトPACSI N2に特異的に結合することを発見した。さらに、Fke034の発現でPACSI N2はFke034と一致して膜に局在した。以上より、Fke034がPACSI N2を膜に誘導することで、PACSI N2の機能を調節することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We isolated two genes of Chlamydia pneumoniae suppressing apoptosis of yeast cells. However, these results were not obtained reproducibly. Fke034 was one of the candidate genes of chlamydial effectors. We confirmed secretion of the gene product from the bacteria into host cell, located peripherally. Expression of the Fke034 promoted host cell apoptosis. We revealed interaction in vitro between the Fke034 protein and PACSI N2, and co-localization of them in infected cells. These findings suggest that Fke034 protein leads PACSI N2 peripherally to regulate the function of PACSI N2.

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：細菌学

キーワード：Chlamydia pneumoniae

1. 研究開始当初の背景

クラミジアは特異な生活環を持つ偏性細胞内寄生性細菌で、その生活環には感染するための基本小体(EB)と増殖するための網様体(RB)の2つの型がある。ヒトの細胞に感染したEBは細胞内でRBに分化し、RBが増殖を遂げた感染後期には再びEBに分化して次の細胞に感染する。

細胞内寄生性細菌は型または型分泌機構を介して自らのタンパク質(エフェクター)を宿主細胞に注入し、宿主細胞の様々な機能を制御している。例えばレジオネラ菌では140を超える数のタンパク質が宿主に分泌されていると言われている。クラミジアは型分泌装置を持つが、そのエフェクターは現在までに20~30しか見つかっていない。偏性細胞内寄生性細菌であるクラミジアにとって宿主細胞の制御が重要であることは容易に想像され、他の菌と同等またはそれ以上のエフェクターを持っていることが考えられる。

クラミジアはその感染中期までは宿主細胞のアポトーシスを抑制することが知られている。偏性細胞内寄生性であるクラミジアが安住の場を確保するために宿主のアポトーシスを積極的に防いでいると考えられる。これまでの研究でこのアポトーシスの抑制には宿主の複数の因子(IAP1, IAP2, XIAP, MCL1, BH-3 only proteins)が関与していることが分かっており、このことは複数のエフェクターが複数の作用機序で宿主のアポトーシスを抑制していることを示唆している。ところが現在までにクラミジアのアポトーシス抑制因子としてわかっているのはchlamydial protease-like activity factor (CPAF)ひとつのみであり、これ以外にもクラミジアには複数の未知アポトーシス抑制因子(エフェクター)が存在すると予想される。逆に感染後期にはアポトーシスが促進される。そこにはアポトーシスを誘導するクラミジア因子が働いている可能性もある。

我々は肺炎クラミジア *Chlamydia pneumoniae* のエフェクターをスクリーニングする目的で、その機能未知遺伝子(約500クローン)のライブラリーを作製した(Tabuchi et al. (2009) *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 2261-2267)。現在までにこのライブラリーから肺炎クラミジアの遺伝子を発現した酵母の増殖抑制を指標にして、エフェクター候補として約60遺伝子を得ている。ただし、この方法では原理上アポトーシスを抑制する因子は同定できない。

肺炎クラミジアは肺炎など呼吸器感染症の原因菌である。さらに同菌は動脈硬化や気管支喘息などとの関連が明らかとなり、社会的にもその対策は重要である。これら疾患では、治療後も肺炎クラミジアの持続感染によって病状が進行する。同菌が動脈壁に持続感染することで長期間にわたる動脈壁の炎症が起こり、動脈硬化が促進されると考えられ

ている。in vitro で化学療法剤(抗生物質)やインターフェロン-(IFN-)の作用を受けたクラミジアはRBからEBへの正常な分化を止め、宿主細胞内で長期間生き続ける。生体内でも同様の機序で持続感染が起ると考えられている。

抗生物質を用いた大規模調査では、化学療法剤が動脈硬化症に有効であるという結果は得られなかった。その原因のひとつとして動脈硬化薬で持続感染する肺炎クラミジアが化学療法に抵抗性であることが挙げられる。すなわち、この結果は動脈硬化への肺炎クラミジアの関与を否定するものではなく、むしろ肺炎クラミジア感染症に対する現在の化学療法の限界を示したもので、今後はクラミジアの持続感染に対する新しい治療法が切望される。

マウスでは肺炎クラミジアが動脈硬化薬に持続感染して動脈硬化を促進する一方で、*Chlamydia trachomatis* は促進しなかった(Blessing E, et al. (2000) *Infect Immun.* 68(12):7195-7)。このことは肺炎クラミジアに特異的な(*C. trachomatis* にない)遺伝子が動脈硬化薬での持続感染に関与している可能性を示している。持続感染時のクラミジアにとっては、宿主細胞をアポトーシスさせずに生き長らえさせる必要がある。逆に言えば、感染細胞をアポトーシスに誘導することができれば、クラミジアの持続感染を食い止めることができる。そのためには、まずクラミジアによるアポトーシスの制御メカニズムを解明することが必須である。そこで、本研究では肺炎クラミジアのアポトーシス制御因子を同定・機能解析し、その結果を基に新しい治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

偏性細胞内寄生性細菌にとって宿主のアポトーシスを制御することは、その生存戦略上非常に重要である。クラミジアの宿主アポトーシス制御機構には不明な点が多く、本研究では我々が既に作成した肺炎クラミジア機能未知遺伝子ライブラリーから新規のアポトーシス制御因子をスクリーニングし、その機能解析を行う。最終的には肺炎クラミジアのアポトーシス制御因子の特異的阻害剤の発見とその臨床応用を目指す。本研究によるクラミジアによるアポトーシス制御機構の解明は、その感染病理を理解するのみならず、これまでにないクラミジア感染症治療薬かつ動脈硬化治療薬の開発につながる事が期待できる。

3. 研究の方法

我々が既に作成した肺炎クラミジア機能未知遺伝子ライブラリー(約500遺伝子)を酵母にそれぞれ発現させ、低濃度酢酸やBax遺伝子の発現で酵母にアポトーシスを誘導する。生き残ったクローンは肺炎クラミジア遺伝子によってアポトーシスが抑制された

ものと考えられ、その遺伝子を肺炎クラミジアのアポトーシス抑制因子として同定し、機能解析を行う。

さらに、同じライブラリーを用いて酵母増殖抑制を指標に得られた遺伝子から、肺炎クラミジアのアポトーシス促進因子を同定し、その機能解析を行う。

スクリーニングによって得られた遺伝子の機能解析は個別で多岐にわたることが予想されるが、最終的には肺炎クラミジアによるアポトーシス制御機構を阻害または促進することによって、感染細胞をアポトーシスに誘導する薬剤の開発とその臨床応用を目指す。

4. 研究成果

肺炎クラミジアはヒトの呼吸器に感染し感冒様症状や肺炎を引き起こす。また近年では動脈硬化症との関連が明らかとなり、その感染が動脈硬化の危険因子ではないかと考えられている。肺炎クラミジアは真核生物の細胞内でのみ増殖が可能な偏性細胞内寄生性細菌であり、同菌にとって宿主のアポトーシスを制御することはその生存戦略上非常に重要である。しかしクラミジアの宿主アポトーシス制御機構には不明な点が多く、未知のアポトーシス制御因子が存在すると予想される。本研究では、我々が既に作成した肺炎クラミジア機能未知遺伝子ライブラリーから、Bax 遺伝子の誘導によって起こる酵母のアポトーシスを抑制するクラミジアの遺伝子をスクリーニングした。

酵母を用いて肺炎クラミジアの 456 機能未知遺伝子から Bax 遺伝子を抑制する遺伝子をスクリーニングした結果、456 クローン中 2 クローン(K002, K014)が得られた。肺炎クラミジア遺伝子 K001 と K013 を持った酵母は誘導培地上での増殖が見られなかったが、得られたクローン K002 と K014 では増殖が観察された。K002 と K014 で肺炎クラミジア遺伝子を誘導せず、Bax 遺伝子のみを誘導すると酵母の増殖が抑制された。得られたクローンから肺炎クラミジア遺伝子を除去すると、Bax 遺伝子の誘導によって再び増殖が抑制されるようになった。これらの結果から、肺炎クラミジア遺伝子 K002 と K014 が酵母のアポトーシスを抑制していると考えられた。K002 または K014 を酵母に導入しなおしたが、Bax 抑制機能が再現しなかった。再現性が高くないことから、これらが本当にアポトーシスを抑制するとの結論に至らなかった。

クラミジアは偏性細胞内寄生性であるがゆえに宿主細胞を制御することが生存戦略上必須であり、そのために多数の病原因子(エフェクター)を宿主細胞に向けて分泌していると考えられる。しかし既知のエフェクターは少なく、未知エフェクターが多数残されていると予想される。クラミジアは III 型分泌装置(T3SS)を持ち、多くのエフェクターがこれによって分泌されていると考えら

れているが、一次構造から T3SS の基質を予測することは容易でない。そこで酵母発現系を用いた病原菌エフェクターの網羅的スクリーニングを用いて、肺炎クラミジアの機能未知遺伝子から酵母増殖阻害を示す 62 個の遺伝子をエフェクター候補として同定した。このうち我々は Chlamydia 属に特異的な Fke034 遺伝子に着目した。

Fke034 は 22 kDa のタンパク質をコードし、その C 末端には proline-rich repeat (PRD) があつた。Fke034-GFP を酵母およびヒト HEp-2 細胞に発現させると、細胞膜への局在が見られた。抗 Fke034 血清で染色したところ、Fke034-GFP は HEp-2 細胞の細胞膜直下に局在していることがわかつた。短縮した Fke034 蛋白質の局在から、HEp-2 細胞内で Fke034 が細胞膜下に局在するためには蛋白質の中央部の存在が必要かつ十分だつた。

Fke034 タンパク質は感染細胞の細胞膜に局在した。GST-PRD タンパク質を用いて pull-down を行つた結果、PRD に特異的に結合する約 60 kDa のタンパク質を得て、これがヒト PACSIN2 であると同定した。Fke034 の PRD と、PACSIN2 の SH3 ドメインが特異的に結合することを明らかにし、さらに HEp-2 細胞内で Fke034-GFP を発現させると、PACSIN2 は Fke034 と一致して膜直下に局在するようになった。これらの結果から、Fke034 が PACSIN2 を膜直下局在に誘導することで、PACSIN2 の機能を調節することが示唆された。

Fke063 タンパク質は宿主の核内に局在し、一方で酵母に発現させるとエンドソームの機能を阻害した。抗 Fke063 抗体は肺炎クラミジアの感染を阻害し、さらに Fke063 タンパク質が肺炎クラミジアの菌体表面に存在することがわかつた。これらの結果は、Fke063 が宿主細胞内に輸送される前に菌体表面に分泌されていることを示唆している。

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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

PACSIN2 に結合する肺炎クラミジア特異的エフェクター分子 A novel Chlamydia pneumoniae effector molecule interacts with PACSIN2

築取 いずみ、安井 ゆみこ、三浦 公志郎、岸 文雄

2013 年 9 月 13 日、第 86 回日本生化学会大会(横浜), 3P-275(3T13p-05)

肺炎クラミジアの新規エフェクター Fke034 は宿主細胞の細胞膜直下に局在する

三浦公志郎、安井ゆみこ、岸 文雄

2013 年 3 月 18-20 日、第 86 回日本細菌学会

総会 (幕張メッセ, 千葉), PA-152

肺炎クラミジアのエフェクター分子の探索と解析

三浦公志郎、河合泰宏、片山晃伸、築取いずみ、安井ゆみこ、尾内一信、岸文雄

2012年9月8日、第30回日本クラミジア研究会 (国立感染症研究所, 新宿), シンポジウム (基礎3) (p 14)

CHARACTERIZATION OF AN EFFECTOR CANDIDATE FKE063 IN CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE

Yasuhiro Kawai, Koshiro Miura, Akinobu Katayama, Yumiko Yasui, Izumi Yanatori, Kazunobu Ouchi, Fumio Kishi

2011年9月6-10日、International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress (Sapporo Convention Center, Sapporo), P-BA07-52 (Sep 7)

型分泌装置のエフェクター候補の解析: 膜に局在する Chlamydomonas 特異的な蛋白質

三浦公志郎、河合泰宏、片山晃伸、築取いずみ、安井ゆみこ、尾内一信、岸文雄

2011年9月3-4日、第29回日本クラミジア研究会 (じゅうろくプラザ, 岐阜), 一般演題2 (Sep 4)

宿主細胞の核に輸送される肺炎クラミジア・エフェクター分子の解析

河合泰宏、三浦公志郎、安井ゆみこ、築取いずみ、尾内一信、岸文雄

2011年9月3-4日、第29回日本クラミジア研究会 (岐阜), 一般演題1

Screening and Analysis of Effector Candidate Molecules from Chlamydomonas pneumoniae Genome

K. MIURA, Y. KAWAI, A. KATAYAMA, I. YANATORI, Y. YASUI, F. KISHI

2011年5月21-24日、The 111th ASM General Meeting (New Orleans Morial Convention Center, New Orleans, LA), Poster #2085 (May 24)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦公志郎 (九州女子大学家政学部・教授)

研究者番号: 30284243

(2) 研究分担者

岸文雄 (川崎医科大学医学部・教授)

研究者番号: 40153077

築取いずみ (川崎医科大学医学部・講師)

研究者番号: 40153077

(3) 連携研究者

()

研究者番号: