

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860223

研究課題名(和文) 寄生性病原体は如何にして宿主細胞の生死を制御するのか？

研究課題名(英文) Analysis of Chlamydia pneumonia effectors controlling host cell death

研究代表者

築取 いずみ (Yanatori, Izumi)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：40454847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎クラミジアは偏性細胞内寄生性細菌であり、ヒトに対し急性・慢性呼吸器感染症を引き起こす。肺炎クラミジアゲノム中の約半分の分子についてはいまだ機能が不明のままであり、さらに感染機構についてはほとんど明らかにされていない。そこで、機能未知455分子について酵母を用いた網羅的スクリーニングを行った結果、アポトーシスを誘導する分子E01、細胞内小胞輸送を引き起こすE02を見出した。E01は発現酵母、ヒト細胞いずれにおいてもミトコンドリアに局在しアポトーシスを引き起こす。またE02は細胞内輸送を担う化学修飾を行う酵素と結合し、影響していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chlamydia pneumoniae is an obligate intracellular pathogen that causes acute and chronic respiratory infections in humans. We found that C. pneumoniae J138 strain featured a putative protein coded by its 1069 open reading frames (ORFs). A comprehensive bioinformatics approach was applied for annotation taxonomy, and approximately half of the predicted ORFs were found to encode proteins without any known functions. To identify novel C. pneumoniae molecules which determine virulence and pathogenicity, we screened 455 ORFs without any known functions in a yeast expression system. We found E01, localized at mitochondria, caused apoptosis in both yeast and mammalian cells, and E02 involved in aberrant vesicular trafficking in host cells. E02 could interact with the enzyme that modifies chemical reaction in host cells. Our study suggests that a novel C. pneumoniae molecule interacts with the enzyme and could cause aberrant vesicle trafficking.

研究分野：細菌学

キーワード：肺炎クラミジア エフェクター 酵母スクリーニング 細胞内輸送異常

1. 研究開始当初の背景

近年、ウイルスや細菌感染によって引き起こされる細胞死は、単に偶発的なものではなく、アポトーシス誘導が原因であることが明らかとなってきた。ヒトの細胞は病原性微生物による感染を受けると、その細胞ごと死滅させることで、個体全体を感染から防御しようと働く。しかし、赤痢菌やサルモネラ菌をはじめとした腸管病原性大腸菌などの感染においては、これらの病原体がアポトーシス誘導活性をもつカスパーゼを抑制することで、宿主細胞のアポトーシスによる細胞死を抑制している。逆にヒト免疫不全ウイルス HIV では、ヘルパー T 細胞にアポトーシスを引き起こすことで、正常の免疫機能を破綻させ、病気の発症を引き起こす。このように、『病原微生物の感染』と『感染細胞の死』は非常に密接に関連しており、少しずつその機構が明らかになってきた。

研究代表者所属の研究室では、2000 年、日本で単離された肺炎クラミジア J138 株の全ゲノム情報を明らかにした。それ以来、肺炎クラミジアを用いることで、偏性細胞内寄生性病原体の感染戦略を明らかにしようとする研究を進めてきた。この 10 年余りの研究により、肺炎クラミジアはエフェクター分子を宿主細胞に送り込むことで、自らが生存・増殖しやすい環境を作り出していることが明らかになってきた。肺炎クラミジアの全 ORF は 1069 個あるが、そのうちの約半数にあたる 455 遺伝子は、いまだその機能が明らかにされていない。これら機能未知分子の中に、肺炎クラミジアが増殖の場所を維持するために、宿主細胞の生死を功名に制御する分子が存在すると考えられる。

2. 研究の目的

肺炎クラミジアは、市中肺炎を引き起こす菌の 1 つで、小児期に初感染を起こし、成人では抗体保有率が 60%以上にのぼる普遍的な病原体である。肺炎クラミジアに対する終世免疫の獲得は難しく、繰り返し感染・持続感染を引き起こしている。さらに、近年の研究により、肺炎クラミジア感染者は多発性硬化症へのリスクが高いこと、動脈硬化症の病巣からほぼ 100%の確率で肺炎クラミジアが検出されており、肺炎クラミジアの『持続感染』による影響は、呼吸器感染に留まらず、全身組織にもたらされることが示唆されている。しかし、偏性細胞内寄生性病原体である肺炎クラミジアを、抗菌薬によって完全に除去することは困難である。また、ワクチンの開発はいまだ成功しておらず、感染予防をすることも難しい。そこで、本研究では以下の 2 項目を目的に研究を行う。

(1) 病原体が宿主細胞アポトーシスを抑制する分子の探索、およびその機能の解明

これまでの研究で作製した酵母での肺炎クラミジア発現システムを用い、酵母にてアポトーシスを抑制する肺炎クラミジア分子を探索する。酵母でのアポトーシス抑制効果を見出した分子が、クラミジアの宿主細胞内増殖段階において、遺伝子・蛋白質の発現が上昇しているかを解析する。さらに、宿主細胞のアポトーシスを抑制するメカニズムを詳細に解析する。

(2) 病原体が宿主細胞アポトーシスを誘導する分子の探索、およびその機能の解明

これまでの申請者の研究により、肺炎クラミジア遺伝子を酵母に発現させると、酵母に増殖抑制を引き起こす分子を 62 個見出している。これらの中には、酵母にアポトーシスを誘導する分子が含まれている可能性が高い。また肺炎クラミジアの増殖サイクルから、感染後期にアポトーシス誘導分子の発現が高くなることが推測される。これらの結果を考慮し、アポトーシス誘導分子の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) アポトーシスを抑制する肺炎クラミジア分子の網羅的スクリーニング

これまでに構築した肺炎クラミジア機能未知遺伝子 455 個を酵母にて発現するシステムを用い、酵母に様々な方法でアポトーシスを誘導し、アポトーシスを抑制する肺炎クラミジア分子の探索を網羅的に行う。酵母にアポトーシスを誘導する方法としては、一般的に用いられる 2 種類の方法を採用し、スクリーニングを行う。

過酸化水素、酢酸によるアポトーシスを抑制する分子の探索

酵母内で産生された活性酸素が引き金となり、酵母カスパーゼが活性化されることで DNA の断片化が進み、アポトーシスが誘導される。過酸化水素は、短時間かつ低濃度でアポトーシスを誘導する点が酢酸とは異なる。そこで、過酸化水素および酢酸の両方でスクリーニングを行う。

Bax によるアポトーシスを抑制する分子の探索

ミトコンドリアのシトクローム c の放出を誘導するヒト Bax 遺伝子をガラクトース誘導プロモーターの下流に組込んだプラスミドと肺炎クラミジア機能未知遺伝子 455 個を酵母で発現し、Bax 発現で引き起こされる酵母のアポトーシスを抑制する肺炎クラミジア分子の探索を行う。

(2) アポトーシスを誘導する肺炎クラミジア分子の探索

これまで、申請者研究室では酵母の増殖抑制を指標として、肺炎クラミジアエフェクター分子の網羅的スクリーニングを行ってきた。その結果、酵母に対して増殖抑制を示す 62 個の分子を見出すことに成功した。この中には、アポトーシスを誘導することで酵母の増殖抑制を起こしているものが含まれている可能性が高く、この 62 個のエフェクター

候補分子の中から、アポトーシスを誘導する分子を探索する。方法としては、Tunel 法や Annexin V を用いた方法により、アポトーシスが誘導されている酵母を選択する。

(3) 宿主細胞へ影響する分子の探索

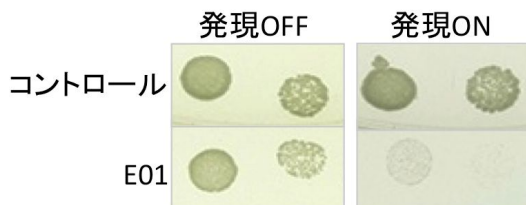
宿主細胞のアポトーシスを制御する際、細胞内輸送経路に大きな影響を与えることが知られている。そこで、宿主細胞の生死を指標とした上記スクリーニングにくわえ、細胞内輸送経路の異常によるアポトーシス関連分子の探索を行う。

4. 研究成果

本研究では、酢酸や Bax 遺伝子発現によって引き起こされるアポトーシス抑制因子の探索を行った。様々な条件において、個々の肺炎クラミジア分子にアポトーシス抑制効果があるかの検討を行ったものの、候補分子を得ることはできなかった。これは、アポトーシスは複雑なカスケード反応が統合して行われる反応であり、肺炎クラミジア一つでは、抑制効果が十分に発揮できないことが主たる要因ではないかと予測される。

一方で、アポトーシス誘導分子については複数の候補分子を見出すことに成功した。本研究では E01 分子に注目して研究をすすめた。E01 分子は、肺炎クラミジアと同属のクラミジアトラコマティスにも相同分子の存在が確認されている。しかしながら、その機能の詳細は明らかにされておらず、また相同性も約 35% と高くはないことから、肺炎クラミジアとクラミジアトラコマティスでは異なる機能を持つことも推測される。

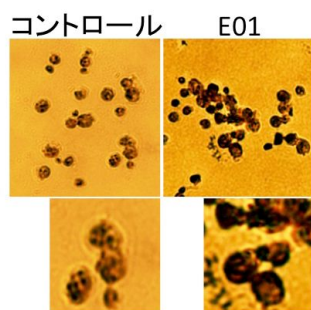
(1) E01 分子の発現酵母への影響



E01 を酵母に形質転換させ、その発現を誘導すると上記のように酵母の発育が強く抑制されることが明らかとなった。そこで、この発育抑制の表現型が、酵母に対するどのような機構によって引き起こされているかを明らかにした。

(2) TUNEL 法によりアポトーシスの誘導の観察

アポトーシス誘導の基本的な解析法である TUNEL 法を用いて、E01 発現細胞においてアポトーシスの誘導の有無を解析した。

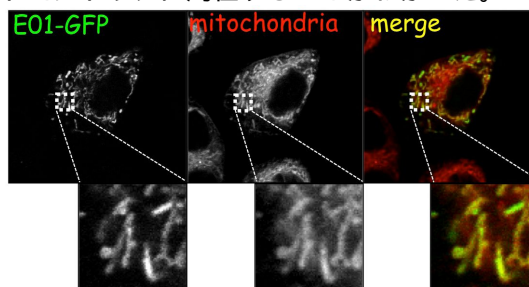


TUNEL法を用いたアポトーシス解析

その結果、大部分の E01 発現酵母は TUNEL 陽性（細胞が黒く染色）であり、アポトーシスを引き起こしていることがわかった。

(3) ヒト細胞での発現

E01 をヒト上皮系細胞に発現させると、ミトコンドリアに局在することがわかった。



このことは、E01 がミトコンドリアで作用することで、宿主細胞にアポトーシスを引き起こしていることを強く示唆するものである。

(4) 細胞内小胞輸送異常を引き起こす分子の探索

酵母を用いた、小胞輸送異常を引き起こす分子の探索を行ったところ、10 個の分子を見出すことに成功した。この中の 2 分子は、すでに宿主細胞内小胞輸送に異常を起こすことが明らかになっている分子であり、このスクリーニングが効果的に働いていることがわかる。E02 は、クラミジアトラコマティスにも相同分子があるものの、その機能は全く不明である。この分子に結合する宿主分子を探索したところ、細胞輸送に関係する酵素へ結合することを明らかにした。すなわち、この分子は、この酵素の機能異常を引き起こすことで、肺炎クラミジアの感染を成立させている。また、E02 は肺炎クラミジアが網様体へと形態を変化させ、活発に増殖を行う時期に特異的に発現が上昇する。すなわち、この時期に宿主に作用する重要な分子である。E02 と宿主細胞の生死間に直接的な関連性は、現段階では見出すことができていないが、今後さらなる詳細な解析をすすめ、E01、E02 感染における役割を明らかにしていく予定である。

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 1 件)

Izumi Yanatori, Yumiko Yasui, Kazunobu Ouchi, and Fumio Kishi
Chlamydia pneumoniae CPj0783 interacts with Huntingtin-interacting protein 14.
International Microbiology 2016 in Press
 (査読有り)

〔学会発表〕(計 5 件)

築取 いずみ, 今田 潔, 岸 文雄
 肺炎クラミジア分子 CPj0783 は Huntingtin-interacting protein 14 に結合

する

第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 23 日
大阪国際交流センター（大阪市）

築取 いずみ、尾内 一信、岸 文雄
宿主細胞の小胞輸送システム異常を引き起
こす肺炎クラミジアエフェクター分子の探
索

第 33 回日本クラミジア研究会 2015 年 10 月
25 日

岡山大学鹿田キャンパス（岡山市）

築取 いずみ、安井 ゆみこ、岸 文
雄

宿主細胞の生死を制御する肺炎クラミジア
エフェクター分子

第 88 回日本細菌学会総会 2015 年 3 月 26 日
長良川国際会議場（岐阜市）

Izumi Yanatori, Yumiko Yasui, Kazunobu
Ouchi, Fumio Kishi

GENOMIC SCREENING OF CHLAMYDOPHILA
PNEUMONIAE EFFECTORS CONTROLLING THE HOST
CELL DEATH BY USING YEAST EXPRESSION
SYSTEM.

Thirteenth International Symposium on
Human Chlamydial Infections 2014 年 6 月
23 日 Pacific Grove (U.S.A.)

Yumiko Yasui, Izumi Yanatori, Kazunobu
Ouchi and Fumio Kishi

GENOMIC SCREENING OF CHLAMYDOPHILA
PNEUMONIAE EFFECTORS REGULATING HOST
INTRACELLULAR VESICLE TRAFFICKING BY
USING YEAST EXPRESSION SYSTEM.

Thirteenth International Symposium on
Human Chlamydial Infections 2014 年 6 月
23 日 Pacific Grove (U.S.A.)

〔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

築取 いずみ (YANATORI, Izumi)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：40454847

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：