



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	偏性細胞内寄生性細菌クラミジアの宿主細胞への適応機構に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	石田, 香澄
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第11864号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58647
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kasumi_Ishida_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）

氏名： 石田 香澄

審査委員	主査	特任教授	小林	清一
	副査	教授	石津	明洋
	副査	教授	山口	博之

学位論文題名

偏性細胞内寄生性細菌クラミジアの宿主細胞への適応機構に関する研究

当審査は平成 27 年 1 月 28 日（水）実施の公開発表（出席者 13 名）及び審査委員による学位論文の個別審査にて行われた。

本学位論文は 4 章から構成されており、第 1 章ではクラミジアの発見から細菌として同定され、更に 16SrRNA 遺伝子の系統解析によってクラミジア目が 8 科へと分類される過程を経て、その後の主要なクラミジア関連論文をレビューしつつ、本研究の目的と意義を述べている。クラミジアは種々のヒト疾患の病原体となる「病原性クラミジア」とアメーバなどの原生動物と共生する「環境クラミジア」に 2 分される。病原性クラミジアのゲノムサイズは環境クラミジアのその約 1/2 以下にスリム化しており、7～10 億年前に両者が分枝したのち、それぞれが異なる宿主細胞に感染して生存し続ける過程においてゲノムの喪失と獲得という適応進化が起こったと考えられている。しかし、両者は独自に進化したにも関わらず、クラミジア目としての共通の特徴を保持している。それが「偏性細胞内寄生性」及び「増殖環」という独自の生存・増殖様式であり、もう一つはクラミジアの「分泌装置」とそこから分泌される「エフェクター分子」を利用した宿主細胞内での生存戦略である。著者はこれらの共通した特徴に注目し、クラミジアの宿主細胞への適応機構を解明することがクラミジア研究の最も重要な課題であると認識し、本研究を遂行した。

第 2 章では、著者らのグループが本学近郊の自然環境から分離・株化したアメーバから発見していた新規環境クラミジア *Neochlamydia* S13 について、膨大なドラフトゲノム解析を行った。他の環境クラミジアとの比較解析から、*Neochlamydia* S13 の感染特性を説明しうる遺伝子の欠落と獲得を見出し、*Neochlamydia* S13 と宿主アメーバとの共生メカニズム並びにその生物学的意義についての新知見を示した。すなわち、*Neochlamydia* S13 は宿主アメーバへの感染率は 100% であるが、他の未感染アメーバには再感染できないという特性を有する。ドラフトゲノム解析により、*Neochlamydia* S13 には TCA サイクルに関わる殆どの酵素の消失、不完全な呼吸鎖、核酸代謝酵素の欠落、増殖環に必要な蛋白の欠損などが推定され、*Neochlamydia* S13 が宿主アメーバの代謝経路に強く依存して持続感染せざるをえない理由を説明した。更に、宿主アメーバの細菌排除機構のターゲットとなる外膜蛋白質の大部分や細菌排除を誘導するシグナルとなる IV 型分泌装置をコードする遺伝子群が *Neochlamydia* S13 では欠落していることも、宿主アメーバ内での持続感染を可能とする適応進化であると推定している。しかし、*Neochlamydia* S13 の持続感染は宿主アメーバの増殖能や運動能を低下させるなど、アメーバに少なからぬ悪影響を及ぼすにも関わらず、*Neochlamydia* S13 の持続感染を許容しているのは何故か。著者は過酷な自然環境下でアメーバが生存するために *Neochlamydia* S13 の持続感染を利用していると予想し、アメーバを破壊する天敵であるレジオネラ菌への感染防御について解析した。別の環境クラミジア *Protochlamydia* R18 感染アメーバ及び *Protochlamydia* R18 除菌アメーバ、共生細菌が存在しない C3 アメーバでは、い

ずれもレジオネラの細胞内増殖が認められた。一方、*Neochlamydia* S13 感染アメーバでは、レジオネラの細胞内増殖が抑制され、*Neochlamydia* S13 除菌アメーバではレジオネラ増殖抑制が解除されたことから、*Neochlamydia* S13 が宿主アメーバのレジオネラ感染防御機構に寄与していることを示唆した。その詳細なメカニズムは今後の課題であるが、ドラフトゲノム解析から、他の環境クラミジアには存在しない leucine-rich repeat (LRR) やアンキリンドメインを含む *Neochlamydia* S13 固有の蛋白質が宿主アメーバでのレジオネラ増殖制御に重要な役割を担っている可能性を示唆した。

第3章では、病原性クラミジアのヒト宿主細胞への適応機構を解析するために、グラム陰性細菌に広く保存されているⅢ型分泌装置から分泌されるエフェクター分子に着目した。特に、Ⅲ型分泌装置のプラグ及びフェクター蛋白質として機能する CopN は、クラミジアの細胞内増殖に必要であることが既に報告されているが、その標的分子についての解析は不十分であることから、著者は未知の CopN 標的分子の同定を試みた。*C. pneumoniae* と *C. trachomatis* から CopN 遺伝子をクローニングし、大腸菌に発現させた GST 融合 CopN 蛋白質を精製して HEp-2 細胞溶解液とのプルダウンアッセイを行い、*C. pneumoniae* の CopN 蛋白質とのみ結合する 40 kDa の蛋白質を検出した。質量分析からこの結合蛋白質は解糖系酵素の一つである aldolase A と判明した。今までに、aldolase A は F-actin、 α -tubulin、light chain dynein、WASP、Band 3 anion exchanger、phospholipase D (PLD2)、glucose transporter GLUT4、inositol trisphosphate、V-ATPase and ARNO など数多くの蛋白質と結合し、解糖系酵素活性以外の「moon light」機能が想定されている。著者の発見は、*C. pneumoniae* の CopN が aldolase A との結合を介して、クラミジア増殖に有利な細胞内環境を創出することを推定させる。実際に、著者は siRNA で aldolase A をノックダウンした HEp-2 細胞では、*C. pneumoniae* の感染粒子数が有意に増加することや、*C. pneumoniae* 感染細胞では aldolase A を含む解糖系酵素遺伝子の発現上昇傾向が起こることも見出しており、aldolase A がクラミジア感染に対する宿主細胞の防御機構の一翼を担っていると推定している。更に、aldolase A の断片化は caspase-1 を介する細胞死を誘導するとの報告から、CopN の結合は aldolase A の断片化を阻止して感染細胞の細胞死を抑制し、クラミジアの長期感染を可能にしていることも考察している。

第4章の総括では、第2章及び第3章の研究成果から、環境クラミジア *Neochlamydia* S13 と宿主アメーバとの共生様式モデルと病原性クラミジア *C. pneumoniae* のⅢ型分泌装置エフェクター分子 CopN と宿主細胞の aldolase A との結合を介した細胞内生存戦略モデルを提唱すると共に、クラミジアの宿主細胞への適応機構解明に向けての新たな課題も提起した。

以上、本研究において明らかにした環境クラミジアと病原性クラミジアの宿主細胞への適応機構に関する新知見の一部は、英語論文2編として既に発表済みであり、クラミジア研究の発展や病原性クラミジアによる感染症克服への新たな予防法や治療法開発に大きく貢献するところ大である。よって著者は、北海道大学博士（保健科学）の学位を授与される資格あるものと認める。