HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	病原性クラミジアの感染宿主細胞での生存戦略に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	山﨑, 智拡
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第12296号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61801
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiro_Yamazaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

様式　５

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）　　氏名：山　﨑　　智　拡

学位論文題名

病原性クラミジアの感染宿主細胞での生存戦略に関する研究

クラミジアは、眼疾患トラコーマの病原因子として 1907 年に初めて発見され、現在は全 8 科に分類されている。それらは病原性クラミジアと環境クラミジアに大別され、病原性クラミジアは脊椎動物細胞に対して感染能を持つ。クラミジアは独特な二相性増殖環で宿主細胞内でのみ増殖する偏性細胞内寄生性という特徴がある。この特徴により、クラミジア培養には感染宿主となる細胞の培養が必須となり、クラミジア研究は他の細菌に比べ立ち遅れてきた。病原性クラミジアの *Chlamydia trachomatis*（性器クラミジア）はヒト細胞に感染し、眼疾患トラコーマや性感染症の原因として感染拡大が問題となっているが、根本的な予防法や治療法は存在しない。クラミジアの特異な増殖機構に関する研究はかなり進んできている一方で、他細菌との相互作用や宿主環境に依存した変化、遺伝子変異技術など、病態形成機構や生体内生存戦略に絡む多くの部分は未知のままである。そこで、本論文ではこれまで焦点を向けられることの少なかったクラミジア研究領域である他細菌との相互作用による生存性の変化、宿主環境による性器クラミジア株間の遺伝子配列比較、遺伝子導入実験の 3 つのテーマで、病原性クラミジアの感染宿主細胞での生存戦略の一端を明らかにするために研究を行った。

性器クラミジアの主要感染局所である女性生殖器粘膜面は多数の常在細菌が存在しており、性器クラミジアの生存性に影響を与えている可能性が高い。また、我々の以前の研究で、健常妊婦の膣検体から、性器クラミジアと *Ureaplasma parvum*（ウレアプラズマ）の混合感染頻度が有意に高いこと示した。このことから、ウレアプラズマが性器クラミジアの増殖に何か影響を与えているのではと考え、ウレアプラズマ存在下で、性器クラミジア増殖能の変化を検討した。また、性器クラミジアに対する生体内主要防御因子インターフェロン - ガンマ（IFN-γ）存在下で、ウレアプラズマの性器クラミジア増殖に対する影響も検討した。その結果、IFN-γ により抑制される性器クラミジア増殖が部分的に回復し、ウレアプラズマ死菌にも生菌同様の効果が得られた。IFN-γ による性器クラミジアの発育抑制効果は、IFN-γ により発現が促進される Indoleamine 2,3-dioxygenase（IDO）が宿主細胞のキヌレニン代謝経路を活性化し、トリプトファンの枯渇を誘導することで起こる。しかしながら、IFN-γ 存在下での IDO 発現量に対し、ウレアプラズマは影響しなかった。つまり、ウレアプラズマが IFN-γ により抑制される性器クラミジア成熟を回復させる効果は、IDO 発現とは独立している可能性が示唆された。この結果は、性器クラミジア感染局所の膣粘膜環境で、免疫機構に対抗する術として周囲の細菌を利用する生存戦略の一端を示唆している。

性器クラミジア性感染症は男女共に炎症反応を起こすが、無症候性感染が多い。女性生殖器には常在細菌が存在し、生理学的かつ解剖学的に男性泌尿生殖器と異なる。これら選択圧の違いは細菌表面分子の特異的変異を導く可能性がある。しかしながら、男性泌尿生殖器からの検体採取は侵襲性を伴うなど組織採取や分離が困難であるため、男性泌尿生殖器分離株は非常に少なく、注目されてこなかった。そ

れ故に本研究では、日本の男性泌尿生殖器分離性器クラミジア株（n＝12）の多型性外膜タンパク質（polymorphic outer membrane protein：Pmp）F を解析し、これら株群と日本の女性膣頸管部分離株群（n＝11）、日本国外の女性膣頸管部分離株群（n＝12）、日本国外の同性愛男性直腸分離株群（n＝7）を Multiple Alignment using Fast Fourier Transform（MAFFT）ソフトウェアで配列同一性と保存性を比較解析した。その結果、性器クラミジア PmpF アミノ酸配列系統は 3 つの異なるクラスターに分類され、日本の男性泌尿生殖器分離株群はクラスター1、2 の 2 つにのみ分類された。PmpF はアミノ末端シグナル配列と外膜に埋め込まれるカルボキシ末端 β-バレルドメイン、外膜表面に露出するパッセンジャードメイン、これらを架橋するヒンジ部を配列上に含み、外膜表面に露出するパッセンジャードメインには多型が生じやすい。そこで、ドメインごと確認したところ、PmpF パッセンジャードメインの系統学的距離値（phylogenetic distance values）は日本の男性泌尿生殖器分離株群が最も配列保存性が高く、他の群に比べ多型性が少ないことが分かった。このことは、性器クラミジアが常在細菌の存在や性差などの環境選択圧に依存し適応している可能性を示唆している。また、男性泌尿生殖器分離株だが、眼疾患株に特有の血清型を持つ株である性器クラミジア No.54 のドラフトゲノム解析を行い、外膜タンパク質コード遺伝子の多型検討を行ったところ、*pmpB* 遺伝子配列がユニークであることを発見した。このことからも、感染部位に依存した環境選択圧の変化に伴う、性器クラミジアの遺伝子多型の誘導が、環境に適合する上で極めて重要な生存戦略である可能性を示唆している。

クラミジアは、宿主細胞への侵入や封入体形成、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、宿主細胞環境を自身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。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。そこで本論文では、カスタマイズ DNA マイクロアレイと 3 つの異なるエフェクター推定ソフトウェア（modalb, effectors, PredictProtein）を用いて、クラミジアの III 型分泌装置新規エフェクター候補遺伝子を推定した。特に、感染初期に利用されるエフェクターは宿主細胞侵入や封入体形成などクラミジア生存戦略に密接に関係する可能性が高いと考えられるため、感染初期に利用されるエフェクターに焦点を当て、感染後期に発現上昇する遺伝子を絞り込んだ。これら遺伝子がコードするタンパク質配列を既知タンパク質情報と照合した結果、ほとんどが仮想タンパク質として関連付けられたが、既知エフェクターも検出された。最終的に、これらが感染後期に発現上昇しているかを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応で確認し、性器クラミジア 8 遺伝子、肺炎クラミジア 7 遺伝子をエフェクター候補遺伝子として選出した。また、クラミジアは偏性細胞内寄生性という特異な性質のために、遺伝子導入・組み換え株の構築が困難であるが、遺伝子操作が可能であれば、エフェクター候補遺伝子の機能推定のための研究に応用できる可能性が極めて高い。そこで、本研究では過去に報告のあった、大腸菌とクラミジアのシャトルベクターを構築し遺伝子導入する方法を用いて、GFP 発現クラミジアを作製した。未だエフェクター候補遺伝子の GFP 融合タンパク質遺伝子導入株は構築できてはいないが、今後のクラミジア研究をさらに発展させる技術であると確信している。