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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12296
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63982
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiro_Yamazaki.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

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

山　﨑　智　拡

北海道大学大学院保健科学院
保健科学専攻保健科学コース

２０１５年度

目次

要約 …5

略語一覧 …8

第 1 章　序章：偏性細胞内寄生性細菌クラミジアについて …10

1-1　第 1 章概要 …11

1-2　緒言 …11

1-3　クラミジアの歴史と分類 …11

1-4　性器クラミジアの特徴 …12

1-5　病原性クラミジアの増殖環 …13

1-6　病原性クラミジアの細胞修飾機構 …14

1-7　結論 …15

1-8　参考文献 …16

第 2 章　性器クラミジアとウレアプラズマの混合感染について …25

2-1　第 2 章概要 …26

2-2　緒言 …26

2-3　対象と方法 …27

2-4　結果 …29

2-5　考察 …30

2-6　結論 …32

2-7　参考文献　…32

第3章　性器クラミジア男性生殖器分離性器株の多型性外膜タンパク質PmpFの特徴とドラフトゲノム解析　…39

3-1　第3章概要　…40

3-2　緒言　…40

3-3　対象と方法　…41

3-4　結果　…43

3-5　考察　…45

3-6　結論　…46

3-7　参考文献　…46

第 4 章　病原性クラミジアの新規エフェクター候補遺伝子の探索と緑色蛍光タンパク質発現性器クラミジアの作製　…59

4-1　第4章概要　…60

4-2　緒言　…60

4-3　対象と方法　…62

4-4　結果　…64

4-5　考察　…66

4-6　結論　…67

4-7　参考文献　…68

第 5 章　統括　…77

5-1　生殖器粘膜面でウレアプラズマと混合感染することで得られる性器クラミジアの生存戦略　…78

5-2　感染環境選択圧に対する細胞外膜タンパク質コード遺伝子の変異を介した病原性クラミジアの生存戦略　…78

5-3　病原性クラミジアの感染宿主細胞内生存戦略を紐解くための新規エフェクター候補遺伝子の探索と遺伝子導入技術について　…79

5-4　今後の展望　…80

謝辞　…82

別冊：第 4 章　性器クラミジア EGFP 発現用プラスミドシャトルベクター配列　…83

要約

偏性細胞内寄生性細菌（細胞内でのみ発育可能な細菌の総称）であるクラミジアは、眼疾患であるトラコーマの病原因子として 1907 年に初めて発見されたが、人工培地上で発育できず、培養に細胞を必要としたことなどからウイルスとして分類されており、1966 年になってようやく細菌と分類された。現在、クラミジアは全 8 科に分類され、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の感染能を持つ。クラミジアは偏性細胞内寄生性という独特な二相性の増殖環により宿主細胞内でのみ増殖するという特徴がある。この特徴により、クラミジアの培養には感染宿主となる細胞の培養が必須となってしまうために、クラミジアに関する研究は他の細菌に比べ立ち遅れてきた。病原性クラミジアである *Chlamydia trachomatis*（性器クラミジア）はヒト細胞にのみ感染し、眼疾患トラコーマや性感染症の原因菌である。感染の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の病態形成機構や生体内での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の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。

1. ウレアプラズマ混合感染が性器クラミジアの増殖に与える影響

性器クラミジア感染における主要感染局所となる女性生殖器粘膜面では多数の常在細菌が存在しており、その存在は性器クラミジアの生存性に全く影響を与えていないとは考えにくい。しかしながら、これまでの性器クラミジア研究では、性器クラミジアの性状にのみ目が向けられることが多く、周囲の環境との相互作用に焦点を当てた研究はほとんどない。そこで本論文では、細菌叢の存在が性器クラミジアの病態形成に与える影響について、その一端を解析した。我々の以前の研究において、健常妊婦の膣サンプルから、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を明らかにした。このことから、ウレアプラズマの存在が性器クラミジアの増殖に何らかの影響を与えている可能性があるのではないかと考え、ウレアプラズマの存在下で、性器クラミジアの増殖能の変化を検討した。また、生体内での性器クラミジアに対する主要防御因子であるインターフェロン - ガンマ（IFN-γ）の存在下において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 によって抑制されるはずの性器クラミジアの増殖能が部分的に回復しており、ウレアプラズマ死菌で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 によって発現が促進される Indoleamine 2,3-dioxygenase（IDO）がキヌレニン代謝経路を活性化することでトリプトファンの枯渇を誘導することによって起こることが明らかとなっている。しかしながら、IFN-γ 存在下での IDO の発現量に対して、ウレアプラズマの存在は影響しないことも確認された。

つまり、ウレアプラズマが IFN-γ によって抑制される性器クラミジアの成熟を回復させている効果は 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、性器クラミジアのヒト生体内感染局所である膣粘膜環境での免疫機構に対抗する術として、周囲に存在する細菌を利用しているという生存戦略の一端を示唆している。

2. 男性生殖器分離性器クラミジア株の遺伝子解析

性器クラミジアによる性感染症は男性と女性共に炎症反応を起こすが、無症候性感染が多い。女性生殖器には男性泌尿生殖器と異なり常在細菌が存在しており、女性の生殖器は生理学的かつ解剖学的に男性の泌尿生殖器と異なっている。これらの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、性器クラミジアの感染患者の多くは無症候性であり、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、性器クラミジアの男性泌尿生殖器分離株は非常に少なく、これまで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から分離された性器クラミジア株（n＝12）の系統学的マーカーでもある多型性外膜タンパク質（polymorphic outer membrane protein：Pmp）F を解析し、これらの株群と日本の女性膣頸管部から分離された株群（n＝11)、日本国外の女性膣頸管部から分離された株群（n＝12)、日本国外の同性愛男性の直腸から分離された株群(n＝7)を Multiple Alignment using Fast Fourier Transform（MAFFT）ソフトウェアで配列の同一性と保存性を比較解析した。その結果、性器クラミジアの PmpF アミノ酸配列の系統は 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から分離された株群はクラスター1 とクラスター2 に分類された。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んでおり、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、ドメインごとの配列保存性を確認したところ、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から分離された株群が最も配列保存性が高く、他の群に比べて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た適応をしている可能性を示唆している。また、性器クラミジア No.54 が男性泌尿生殖器から分離された株でありながら、眼疾患株に特有な血清型を持つ株であり、十分に培養増殖可能であったため、ドラフトゲノム解析を行い、外膜タンパク質をコードする遺伝子の多型について詳細な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。

3. 病原性クラミジアの新規エフェクター候補遺伝子の探索と性器クラミジアの遺伝子導入技術の推進

偏性細胞内寄生性細菌である性器クラミジアは、宿主細胞への侵入や封入体の形成、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の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、クラミジア感染初期に利用されるエフェクターに焦点を当て、感染後期に発現が顕著に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、既知のエフェクターも検出された。最終的に、これらがクラミジア感染後期に発現上昇していること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。現在のところ、エフェクター候補遺伝子の GFP 融合タンパク質の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。

略号一覧

AB：aberrant body
ATCC：American Type Culture Collection
BLASTp：protein-protein Basic Local Alignment Search Tool
cDNA：complementary deoxyribonucleic acid
CdsB：contact-dependent secretion proteinB
CFP-10：culture filtrate protein of 10 kDa
CFU：colony forming units
CopB：chlamydial outer protein B
CopN：chlamydial outer protein N
CPAF：chlamydia protease-like activity factor
DDBJ：DNA Data Bank of Japan
DMEM：Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA：deoxyribonucleic acid
EB：elementary body
EGFP：enhanced green fluorescent protein
EMS：ethylmethane sulfonate
ESAT-6：early secreted antigenic target of 6 kDa
EtBr：ethidium bromide
FCS：fetal calf serum
FITC：fluorescein isothiocyanate
GAPDH：glycer aldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP：green fluorescent protein
HEPES：4-(2-hydroxy ethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid
IDO：indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN-γ：interferon-gamma
IFU：inclusion forming units
IgG：immuno globulin G
IgG+M(H+L)：immuno globulin G and H (heavy chain and light chain)
IL-1β：interleukin-1 beta
IncA：inclusion membrane protein
KEGG：Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LGV：lymphogranuloma venereum
LPS：lipopolysaccharide
MAFFT：Multiple Alignment using Fast Fourier Transform
MCP-1：monocyte chemoattractant protein-1
MCS：multicloning site

MOI：multiplicity of infection
NCBI：National Center for Biotechnology Information
NEB：New England Biolabs
NF-κB：nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated Bcells
ORF：open reading frame
ori：origin of replication
PCR：polymerase chain reaction
PmpB：polymorphic outer membrane protein B
PmpF：polymorphic outer membrane protein F
Pmps：polymorphic outer membrane proteins
PPLO：pleuropneumonia-like organism
PVDF：polyvinylidene difluoride
qRT-PCR：quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RAST：Rapid Annotation using Subsystem Technology
RB：reticulate body
Ref：reference
RNA：ribonucleic acid
rRNA：ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR：reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE：sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis
SMART：Simple Modular Architecture Research Tool
SNARE：soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment protein receptor
TARP：translocated actin-recruiting phosphoprotein
TLR：Toll-like receptor
TNFα：tumor necrosis factor-alpha
tRNA：transfer ribonucleic acid
UV：ultraviolet

第 1 章

序章：偏性細胞内寄生性細菌クラミジアについて

1-1　第 1 章概要

第 1 章ではクラミジアという細菌の歴史や分類、特徴について説明するとともに、本研究の背景と目的についてまとめる。

偏性細胞内寄生性細菌であるクラミジアは、眼疾患であるトラコーマの病原因子として 1907 年に初めて発見された。しかしながら、クラミジアは培地上で発育させることができず、当時の濾過滅菌では処理しきれなかったことからウイルスとして分類されていたため、クラミジアが細菌として分類されたのは 1966 年になってからである。現在、クラミジアは全 8 科に分類され、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る。病原性クラミジアはヒトなどの脊椎動物細胞に感染し、病気を引き起こす。クラミジアは、大腸菌などの他の細菌には類を見ない二相性の増殖環と呼ばれる独特な様式で細胞内でのみ増殖する、偏性細胞内寄生性細菌である。この特異な性質は一般的な細菌培養法での本菌の培養を困難にし、クラミジアの研究が他の細菌に比べ立ち遅れている要因となっている。その中で、*Chlamydia trachomatis*（性器クラミジア）は病原性クラミジアに分類され、宿主域はヒト細胞に限定されており、その特異的な細胞内増殖様式や生体内防御機構などに関する研究は進んできている。本論文では他細菌との相互作用や宿主環境による差異や宿主細胞への侵入、宿主細胞内に分泌されるクラミジアタンパク質の推定、遺伝子変異技術の研究を介して性器クラミジアの新たな感染宿主細胞での生存戦略を明らかにするべく研究を行った。

1-2　緒言

本研究の主要な対象はクラミジアという細菌であり、本細菌は偏性細胞内寄生性という特異な性質を持つ。この性質は、大腸菌などの一般的な細菌とは異なり、特異的な宿主細胞内に感染し、宿主細胞内部でのみ生存し、増殖可能であるという性質である。この特異的な性質のために、クラミジアの培養から検出、様々な研究操作を技術的かつ対費用効果面においても困難にさせ、他の細菌に比べて研究が立ち遅れてしまっている。しかし、クラミジアが初めて発見されてから 100 年以上たった現在では、徐々にではあるが着実に研究が進み、様々な興味深い性質が明らかになりつつある。その例としては、他細菌に類を見ない二相性の増殖環を持つことやエネルギー代謝経路が不完全であること、他の細菌同様に分泌装置を有し宿主細胞にエフェクタータンパク質を輸送・注入して細胞内環境を最適化するなどの極めて重要な生物学的発見が報告されてきた。そこで、本章では、過去の報告を踏まえ、他の細菌に類を見ない独特なクラミジアの感染動態や細胞内増殖様式と細胞内環境の最適化機構について解説し、本研究の背景と目的について述べる。

1-3　クラミジアの歴史と分類

クラミジアは、古くは紀元前から中国やエジプトなどの古代文明において失明の原因として存在が知られ、エジプトの古代書物や中国の古代史跡にもその記載があったといわれている[1]。また、経済発展が進む江戸時代中期の人口停滞が、梅毒やクラミジアによる性感染症の蔓延に伴う不妊が原因の可能性が高いという報告もあり、人類史上においてクラ

ミジア感染症の存在は見えない恐怖として知られてきた[2]。クラミジア菌体の発見は、1907 年に Halberstädter と von Prowazek によって、インドネシアのジャワ島で眼疾患トラコーマ患者の結膜上皮細胞をギムザ染色することで、細胞内小胞を確認したことが最初の報告である。また、小胞内で青色に染色されたクラミジアの菌体粒子が封入体膜に囲まれており、マント羽織っているように見えたことから、ギリシャ語でマントを意味する“*khlamus*”に由来し、マントを纏った原生動物という意味の“*Chlamydozoa*”と名付けられた[3-5]。現在でも、“*Chlamydozoa*”に由来する“*Chlamydia*”という名称はクラミジア門・綱（*Chlamydiae*）、クラミジア目（*Chlamydiales*）やクラミジア科（*Chlamydiaceae*）、性器クラミジア（*Chlamydia trachomatis*）や肺炎クラミジア（*Chlamydia pneumoniae*）、オウム病クラミジア（*Chlamydia psittaci*）などの属名に利用され続けている[5]。眼疾患トラコーマ患者の結膜上皮細胞からクラミジアが検出された一方で、1910 年代になると尿道炎や子宮頚管炎などの泌尿生殖器の炎症性疾患患者や、新生児非淋菌性結膜炎患者の結膜細胞からもギムザ染色に染まる同様の小胞が検出された[6, 7]。さらに同年代に鼠径リンパ肉芽腫（LGV）患者の患部からもギムザ染色に染まる同様の小胞が検出された[8]。また、1920 年代にはオウム病が世界的に流行し、オウム病の原因菌としてクラミジアが分離培養された[3, 9, 10]。LGV やオウム病の原因菌であるクラミジアは細胞培養環境で分離することが可能であったが、当時のろ過滅菌では滅菌できず、その他の細菌のように人工培地上で培養できなかったことから、当初は、原生動物でも細菌でもなく、ウイルスであると考えられていた[11]。さらに、1942 年には、トラコーマを引き起こす病原体にも LGV やオウム病のクラミジアと共通の補体結合抗原が同定され、トラコーマの原因とされていた小胞もクラミジアであることが明らかになった[12]。加えて、クラミジアには DNA と RNA が両方とも存在し、リボソームを有していることが証明され、1966 年に細菌として分類された[13]。また、ペプチドグリカン層はこれまでないと考えられてきたが、ペニシリンによって細胞分裂や増殖が阻害されるなどの様子からペプチドグリカン様構造（合成酵素の一部を欠き、通常のペプチドグリカンとは異なる様である）を持つことも分かっている[15, 16]。そして、クラミジアの分類は幾度かの変遷を経て、1999 年に Everett らによって、クラミジアの *16S rRNA* 遺伝子配列の系統解析報告によって一様の統一を得た[14]。2015 年 12 月現在では、さらに一部の改変を経て、クラミジア科は 8 科に分類されている（表 1）[17-20]。現在では一般的に、哺乳動物を主な宿主としている”*Chlamydiaceae*”科に属するクラミジアを「病原性クラミジア」、それ以外の科に属するクラミジアを「環境クラミジア」と呼称し大別している。しかしながら、この 2 つの括りは曖昧であり確定的な名称ではないため、しばしば異なる呼称が用いられたり、所属する菌の範囲が異なっていたりする場合がある。本論文ではこの「病原性クラミジア」という言葉を使用しており、研究に使用した性器クラミジアと肺炎クラミジアが含まれている。

1-4　性器クラミジアの特徴

性器クラミジア（*Chlamydia trachomatis*）血清型 A-C 型（外膜タンパク質 OmpA の多型に基づく分類）は眼疾患トラコーマの原因菌である。現在でも、トラコーマはアフリカや

アジアなどの発展途上国において、公衆衛生環境が整っていない地域で感染が蔓延しており、主要な失明の原因となっている[21]。しかしながら、トラコーマは原因菌である性器クラミジアに対する抗菌薬治療が可能であり、日本やアメリカなどの先進国ではトラコーマが原因で失明にいたることはほとんどない[3, 22]。一方で、性器クラミジア血清型 D-K 型は性感染症の原因菌でもあり、先進国を中心として流行し、性器クラミジア性感染症は世界的に年間約 500 万人が新規に感染するとされ、感染の拡大が問題となっている[23]。日本では年間 20,000 人以上の感染が報告されており、最も感染者数の多い性感染症起因菌である（図 1）[24]。また、男性同性愛者の間で流行した鼠径リンパ肉芽腫症の原因は性器クラミジア血清型 L1-L3 型である。性器クラミジア感染症は、感染者の多くが無症候性であり、気付かぬうちに不特定のパートナー間で感染が拡大するという特徴がある。また、治療の遅延により症状が悪化し、男性では尿道炎、女性では卵管炎や骨盤内炎症性疾患を引き起こし、生殖器上皮細胞の線維化によって、最終的には不妊の原因となる[25]。また、抗体が産生されても細胞内に寄生するクラミジアには反応できないことに加え感染者の多くが無症候性であり気付かぬうちに性行為によって感染してしまうため、抗菌剤治療後の再発も高頻度に見られるのも特徴であり[26]、再感染も容易であることから性器クラミジア性感染症の根治は非常に困難であると考えられている[27]。それ故に、性器クラミジア感染症を的確に捉えコントロールする根本治療法を見いだすべく性器クラミジアの細胞内生存様式や細胞修飾機構の研究が盛んに行われてきた。しかしながら、性器クラミジアも含めたクラミジアの持つ偏性細胞内寄生性という特異な増殖様式のために、大腸菌など他の一般的な病原細菌に比べて遺伝子操作技術などの様々な研究が立ち遅れているのが現状である。

1-5　性器クラミジアの増殖環

前項に示したように、性器クラミジアを含めたクラミジア科の細菌に共通した特徴として、宿主細胞に感染し増殖環と呼ばれる特異な増殖様式を持ち、細胞外では増殖できない“偏性細胞内寄生性”という特徴を持つ。まず、クラミジアは基本小体（EB : elementary body）という、感染できるが増殖能を持たない形態で細胞に付着、感染する。EB は細胞に感染する際に、宿主の食胞様構造から宿主細胞膜を利用して封入体（inclusion）と呼ばれる小胞を作り、その封入体内で網様体（RB : reticulate body）という、増殖能はあるが感染能を持たない形態に分化し、2 分裂増殖する。増殖に伴い封入体は拡大し、RB は再び EB へと分化し、封入体が細胞外へ突き出し、放出されるか、あるいは細胞膜が破壊されることで菌体外に放出されて、新たな細胞へと再感染し、再び増殖間を開始する[28]。このように 2 つの形態への分化を交互に繰り返し、宿主細胞内で増殖する“二相性の増殖環”という特殊な増殖形式で増殖する（図 2）。この特殊な増殖形式のために、感染宿主における獲得免疫が作られにくく、仮に抗体が産生されても細胞外の菌体には反応できても、細胞内で増殖する菌には接触できないために抗菌効果が弱い[3, 29]。その一方で、クラミジアは感染宿主細胞自身が持つ自然免疫反応である貪食作用やプログラム細胞死（アポトーシス）による異物除去プログラムから逃れるための様々な細胞修飾機構も進化させている。

1-6　性器クラミジアの細胞修飾機構

性器クラミジアは二相性の増殖環によって宿主細胞内で増殖する際、増殖に必要不可欠だが自身で生合成できない栄養を宿主細胞から奪取する必要があり、菌体表面に存在する分泌装置から菌体タンパク質を宿主細胞に分泌（エフェクタータンパク質と呼ばれている）することにより、宿主細胞環境を自身の発育に適した状態へと作り変えていると考えられている。このエフェクタータンパク質を分泌するシステムのことを、分泌装置と呼び、現在では 7 種類（I 型-VII 型）の存在が明らかになっている[30]。この 7 つの分泌装置は細菌細胞壁中で見つかっており、エフェクタータンパク質を菌体外空間に分泌するものと宿主細胞に直接注入するものがある。I 型分泌装置は α‐haemolysin の様なカルボキシ末端側のシグナル配列を認識し 1 段階でエフェクタータンパク質を細胞外へ分泌する。II 型分泌装置は細胞内膜上に存在する Sec-または Tat-トランスロコンと呼ばれる輸送装置によってエフェクタータンパク質のアミノ末端側シグナル配列を認識し周辺質へエフェクタータンパク質を輸送し、周辺質にてタンパク質の折り畳み修飾を受け、細胞内膜に存在するピストン様構造によって細胞外膜孔を通過する。III 型分泌装置はインジェクティソーム（injectisome）という注射器に似た針を持つタンパク質複合体であり、宿主細胞膜と密接に結合して病原性因子などのエフェクタータンパク質を菌体細胞質から宿主細胞へと直接分泌する。IV 型分泌装置は III 型分泌装置とよく似た構造を持ち、宿主細胞に直接エフェクタータンパク質を分泌することができるが、多目的な仕組みで DNA やタンパク質を 1 段階あるいは 2 段階に分けて分泌することができる。V 型分泌装置（後述する多型外膜タンパク質 Pmps にもこの機能が備わっていると予想されている）は Sec-トランスロコンを介して周辺質にエフェクタータンパク質を輸送し、カルボキシ末端側の β-バレル構造を介して細胞外膜を通過する 2 段階の分泌をする。VI 型分泌装置はまだ十分に研究がなされてはいないが、コレラ菌（*Vibrio cholerae*）や緑濃菌（*Pseudomonas aeruginosa*）の病原性因子の分泌に必要であり、アミノ末端の Sec-シグナル配列は持たないことが分かっている。VII 型分泌装置はウシ型弱毒結核菌ワクチン（*Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin、カルメット･ゲラン桿菌）の研究過程で発見された､結核菌の（M. tuberculosis）病原因子 ESAT-6（early secreted antigenic target of 6 kDa）と CFP-10（culture filtrate protein of 10 kDa）を Sec-トランスロコン非依存性に分泌する経路であるが、マイコバクテリウム属菌と数種のグラム陽性細菌でしか発見されていない[30]。このような分泌装置が細菌間で広く保存され、利用されている一方で、クラミジアは特に II 型と III 型分泌装置を用いてエフェクタータンパク質の宿主細胞への輸送に利用している[31-34]。II 型と III 型分泌装置の構造や分泌機序は上記のように異なるが、エフェクタータンパク質と呼ばれるタンパク質を宿主細胞に分泌し、プログラム細胞死の抑制や促進、小胞輸送の撹乱や奪取、封入体膜の強化など様々な細胞環境の修飾機構に利用している[35, 36]。エフェクタータンパク質機能の研究が進んでいるタンパク質には CPAF（Chlamydia protease-like activity factor）があり、このエフェクタータンパク質は自己開裂・活性化能を持つセリンプロテアーゼの一種で、II 型分泌装置を介して宿主細胞へ輸送されていることが分かっている[5, 20, 37]。CPAF は宿主細胞のアポトーシスの抑制やクラミジアの脂質の獲得へ中心的な役割を持つことが報告されている

が、近年 CPAF は、自身が持つ強いタンパク質分解活性が実験操作で容易に活性化されてしまうために、人工的なタンパク質合成による研究が難しく、新規解析手法の開発が模索されている[37, 38]。その他にもいくつかのエフェクタータンパク質が知られている。特に III 型分泌装置は、構造タンパク質もほとんど同定されており、エフェクタータンパク質はいくつか同定されている。III 型分泌装置は針状構造をとり、宿主細胞膜を貫通して直接エフェクタータンパク質を細胞内へ分泌し、感染宿主細胞の標的分子の修飾により、クラミジアの生存に適した状態へと感染宿主細胞内環境を作り変えている（図 3）[39, 40]。中でも、機能の研究が進んでいるエフェクターとして、TARP（translocated actin-recruiting phosphoprotein）は、EB が宿主細胞膜に付着した際に分泌され、宿主細胞質アクチンのリン酸化により重合を促進し、細胞骨格を作り変えて上皮細胞へ侵入しやすくしていることが知られている[41]。また、III 型分泌装置から分泌され、封入体膜に挿入されるエフェクターで、封入体膜蛋白 IncA（inclusion membrane protein A）は、宿主の小胞輸送経路における小胞膜融合を担うタンパク質である SNARE（soluble NSF Attachment protein receptor）に非常に類似した構造を持ち、複数の封入体膜同士の融合に関わっており、IncA の欠損した株は感染細胞内に複数の封入体を形成することが知られている（表 2：現在までに明らかになっている主なエフェクタータンパク質の一覧）[41-44]。このように、分泌装置から打ち込まれるエフェクタータンパク質を巧みに利用し、感染宿主細胞内で二相性の増殖環によって再感染を繰り返すということが明らかになってきた（図 4）。しかしながら、現在分かっているエフェクタータンパク質だけでは、クラミジアの増殖様式を詳細に説明しきることは困難である。加えて、偏性細胞内寄生性という特異な性質から、他の細菌と比較して遺伝子操作技術の決定的な遅れのために、クラミジアの細胞修飾機構は不明な点が多い。また、性器クラミジアの感染局所の膣環境には常在細菌など他の微生物も存在し、それぞれの微生物がクラミジアの宿主細胞に様々な影響を与えている可能性があることに加えて、微生物間で相互作用することで病態形成機構の理解を困難にしている可能性が高い。

1-7　結論

本章ではこれまでの報告を基に、クラミジアについての概略を述べた。性器クラミジアは 1907 年に初めて報告されてから、100 年以上が経過し、細菌と分類された 1966 年から 50 年程が経とうとしているが、その特異な“偏性細胞内寄生性”という性質によって、様々な研究方法が困難さを強いられてきた。現在では、ようやく“二相性の増殖環”や“分泌装置によるエフェクタータンパク質の利用”などの細胞内での動態や適応機構が明らかになり、徐々にクラミジアに対する理解が進んできた。しかしながら、性器クラミジアは世界中で年間約 500 万人が新規に感染する性感染症の原因菌であり、感染症を的確にとらえコントロールする抜本的な診断予防法の開発が期待されている。その一方で、性器クラミジアの病態形成機構の解明を困難にしている、感染局所での微生物間相互作用の存在や遺伝子操作技術の困難さなど、未だ研究されていない領域も多々存在するのが現状である。そこで本論文では、他細菌との相互作用や宿主環境に依存した生存性の差異、宿主細胞への侵入や封入体形成などに関わるクラミジアエフェクタータンパク質の推定、遺伝子導入法の実

践を通してクラミジアの生存戦略の一端を解明するべく研究を行った。本博士論文では以下の 3 章でそれぞれの研究結果を示し、詳細を記載する。

- 第 2 章：性器クラミジアとウレアプラズマの混合感染について（第 2 章内容は論文掲載済：*Journal of Infection and Chemotherapy*. Volume 20, Issue 8, 2014, pp.460-464）
- 第 3 章:性器クラミジア男性生殖器分離株の多型性外膜タンパク質 PmpF の特徴とドラフトゲノム解析（第 3 章内容は論文掲載済:*Journal of Infection and Chemotherapy*. volume 21, issue 12, 2015, pp.842–848、*Genome Announcements*. volume 3 number 5, 2015, e01242-15）
- 第 4 章：病原性クラミジアの新規エフェクター候補遺伝子の探索と緑色蛍光タンパク質（GFP）発現性器クラミジアの作製（第 4 章内容は論文未掲載）

1-8　参考文献

1. Taylor HR (2009) Doyne Lecture: trachoma, is it history? *Eye (Lond)*. 23:2007-2022.
2. Johnston WD (2009) Sexually Transmitted Diseases and Demographic Change in Early Modern Japan. *EASTM*. 30:74-92.
3. 熊本悦明、橋爪壮 編著（1988）クラミジア感染症の基礎と臨床. 金原出版株式会社
4. Halberstädter L, von Prowazek S (1907) Uber Zelleinschlüsse parasitarer Natur beim Trachom. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte Berlin.* 26:44-47.
5. Subtil A, Collingro A, Horn M (2014) Tracing the primordial *Chlamydiae*: extinct parasites of plants? *Trends Plant Sci*. 19:36-43.
6. Nunes A, Gomes JP (2014) Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia*. *Infect Genet Evol*. 23:49-64.
7. Lindner K (1910) Zur atiologie der gonokokken-freien urethritis. *Wien Klin Wochenschr*. 8:283-284.
8. Durand NJ, Nicolas J, Favre M (1913) Lymphogranulomatose inguinalë subaigue d'origine génital probable, peut-être vénérienne. *Bulletin de la Société des Médecins des Hôpitaux de Paris*. 35:274-288.
9. Coles AC (1930) Micro-organisms in psittacosis. *Lancet*. 1:1011-1012.
10. Lillie RD (1930) Psittacosis: rickettsia-like inclusions in man and in experimental animals. *Public Health Report*. 45:773-778.
11. Miyagawa Y, Mitamura T, Yaoi H, Ishii N, Okanishi J (1935) Fourth report: studies on the virus of lymphogranuloma inguinale Nicolas, Favre and Durand. Cultivation of the virus on the chrorioallantoic membrane of the chicken embryo. *Jpn J Exp Med*. 13:733-738.
12. Rake G, Jones HP (1942) Studies on lymphogranuloma venereum: I. development of the agent in the yolk sac of the chicken embryo. *J Exp Med*. 75:323-338.
13. Moulder JW (1966) The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses. *Annu Rev Microbiol*. 20:107-130.
14. Everett KD, Bush RM, Andersen AA (1999) Emended description of the order *Chlamydiales*,

proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, inculuding a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol*. 49:415-440.

15. Moulder JW (1993) Why is *Chlamydia* sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan? *Infect Agents Dis*. 2:87-99.
16. McCoy AJ, Maurelli AT (2006) Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly. *Trends Microbiol*. 14:70-77.
17. Greub G (2010) International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of the *Chlamydiae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 60:2691-2693.
18. Niemczuk K, Truszczynski M, Szymanska-Czerwinska M (2012) *Chlamydiales* – Taxonomy, Pathogenecity, and Zoonotic Potential. *Bull Vet Inst Pulawy*. 56:267-270.
19. Aiyar A, Quayle AJ, Buckner LR, Sherchand SP, Chang TL, Zea AH, Martin DH, Belland RJ (2015) Twenty years of research into *Chlamydia*-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae*. *Pathog Dis*. 73:1-15.
20. Horn M (2008) *Chlamydiae* as Symbionts in Eukaryotes. *Annu Rev Microbiol*. 62:113-131
21. 21.20.Goldschmidt P (2015) Social Sciences for the Prevention of Blindness. *Trop Med Health*. 43:141-148.
22. WHO (2006) Trachoma control: a guide for programme managers. (http://www.who.int/topics/trachoma/en/)
23. Horner P (2006) The case for further treatment studies of uncomplicated genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Sex Transm Infect*. 82:340-343.
24. 国立感染症研究所（2014）感染症発生動向調査年別報告数一覧（定点把握） (http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/2085-idwr/ydata/5152-report-jb2013.html)
25. Lusk MJ, Konecny P (2008) Cervicitis: a review. *Curr Opin Infect Dis*. 21:49-55.
26. Walker J, Tabrizi SN, Fairley CK, Chen MY, Bradshaw CS, Twin J, Taylor N, Donovan B, Kaldor JM, McNamee K, Urban E, Walker S, Currie M, Birden H, Bowden F, Gunn J, Pirotta M, Gurrin L, Harindra V, Garland SM, Hocking JS (2012) *Chlamydia trachomatis* incidence and re-infection among young women--behavioural and microbiological characteristics. *PLoS One*. 7:e37778.
27. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL (2008) Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. *Fertil Steril*. 90:328-334.
28. Chin E, Kirker K, Zuck M, James G, Hybiske K (2012) Actin recruitment to the *Chlamydia* inclusion is spatiotemporally regulated by a mechanism that requires host and bacterial factors. *PLoS One*. 7:e46949.
29. Abdelrahman YM, Belland RJ (2005) The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev*. 29:949-959.

30. Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk BJ, Bitter W (2007) Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol*. 5:883-891.
31. Collingro A, Tischler P, Weinmaier T, Penz T, Heinz E, Brunham RC, Read TD, Bavoil PM, Sachse K, Kahane S, Friedman MG, Rattei T, Myers GS, Horn M (2011) Unity in variety: the pan-genome of the *Chlamydiae*. *Mol Biol Evol*. 28:3253-3270.
32. Horn M, Collingro A, Schmitz-Esser S, Beier CL, Purkhold U, Fartmann B, Brandt P, Nyakatura GJ, Droege M, Frishman D, Rattei T, Mewes HW, Wagner M (2004) Illuminating the Evolutionary History of *Chlamydiae*. *Science*. 30:728-730.
33. Bertelli C, Collyn F, Croxatto A, Ruckert C, Polkinghorne A, Kebbi-Beghdadi C, Goesmann A, Vaughan L, Greub G (2010) The Waddlia genome: a window into chlamydial biology. *PLoS ONE*. 5:e10890.
34. Greub G, Collyn F, Guy L, Roten CA (2004) A genomic island present along the bacterial chromosome of the *Parachlamydiaceae* UWE25, an obligate amoebal endosymbiont, encodes a potentially functional F-like conjugative DNA transfer system. *BMC Microbiol*. 4:48.
35. 阿部章夫（2008）「病原最近の分泌装置：その機能と病原性発揮のメカニズム」感染症学雑誌、83:94-100.
36. Fronzes R, Christie PJ, Waksman G (2009) The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*. 7:703-714.
37. Hacker G (2014) The chlamydial protease CPAF: important or not, important for what? *Microbes Infect*. 16:367-370.
38. Chen AL, Johnson KA, Lee JK, Sutterlin C, Tan M (2012) CPAF: A Chlamydial Protease in Search of an Authentic Substrate. *PLoS Pathog*. 8:e1002842.
39. Peters J, Wilson DP, Myers G, Timms P, Bavoil PM (2007) Type III secretion à la *Chlamydia*. *Trends Microbiol*. 15:241-251.
40. Valdivia RH (2008) *Chlamydia* effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology. *Curr Opin Microbiol*. 11:53-59.
41. Mueller KE, Plano GV, Fields KA (2014) New Frontiers in Type III secretion Biolygy: the *Chlamydia* Perspective. *Infect Immun*. 82:2-9.
42. Delevoye C, Nilges M, Dehoux P, Paumet F, Perrinet S, Dautry-Varsat A, Subtil A (2008) SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoS Pathog*. 4:e1000022.
43. Johnson CM, Fisher DJ (2013) Site-specific, insertional inactivation of *incA* in *Chlamydia trachomatis* using a group II intron. *PLoS One*. 8:e83989.
44. Ishida K, Matsuo J, Yamamoto Y, Yamaguchi H (2014) *Chlamydia pneumoniae* effector chlamydial outer protein N sequesters fructose bisphosphate aldolase A, providing a benefit to bacterial growth. *BMC Microbiol*. 14:330.

第 1 章図表

表 1　クラミジア目に属する科（Family）と種（species）の分類

Family*	species
Chlamydiaceae	*Chlamydia trachomatis* *Chlamydia pneumoninae* *Chlamydia psittaci* *Chlamydia muridarum* *Chlamydia suis* *Chlamydia pecorum* *Chlamydia felis* *Chlamydia abortus* *Chlamydia caviae*
Simkaniaceae	*Simkania negevensis* *"Candidatus Fritschea eriococci"* *"Candidatus Fritschea bemisiae"*
Rhabdochlamydiaceae	*"Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis"* *"Candidatus Rhabdochlamydia crassificans"*
Waddliaceae	*Waddlia chondrophila* *Waddlia malaysiensis*
Criblamydiaceae	*Criblamydia sequanensis*
Parachlamydiaceae	*Parachlamydia acanthamoebae* *Protochlamydia amoeb phila* *Protochlamydia neagleriophila* *Neochlamydia hartmannellae*
Piscichlamydiaceae	*"Candidatus piscichlamydia salmonis"*
Chlavichlamydiaceae	*"Candidatus Chlavichlamydia salmonicola"*

*クラミジア目に属する細菌科は 8 科があり、それぞれの科には表の様な種が報告されている。*Chlamydiaceae* 科に属するクラミジアは病原性クラミジアと呼ばれ（青）、それ以外の科を環境クラミジア（オレンジ）と呼ぶ。参考文献 20 を参考に改変した。

図 1

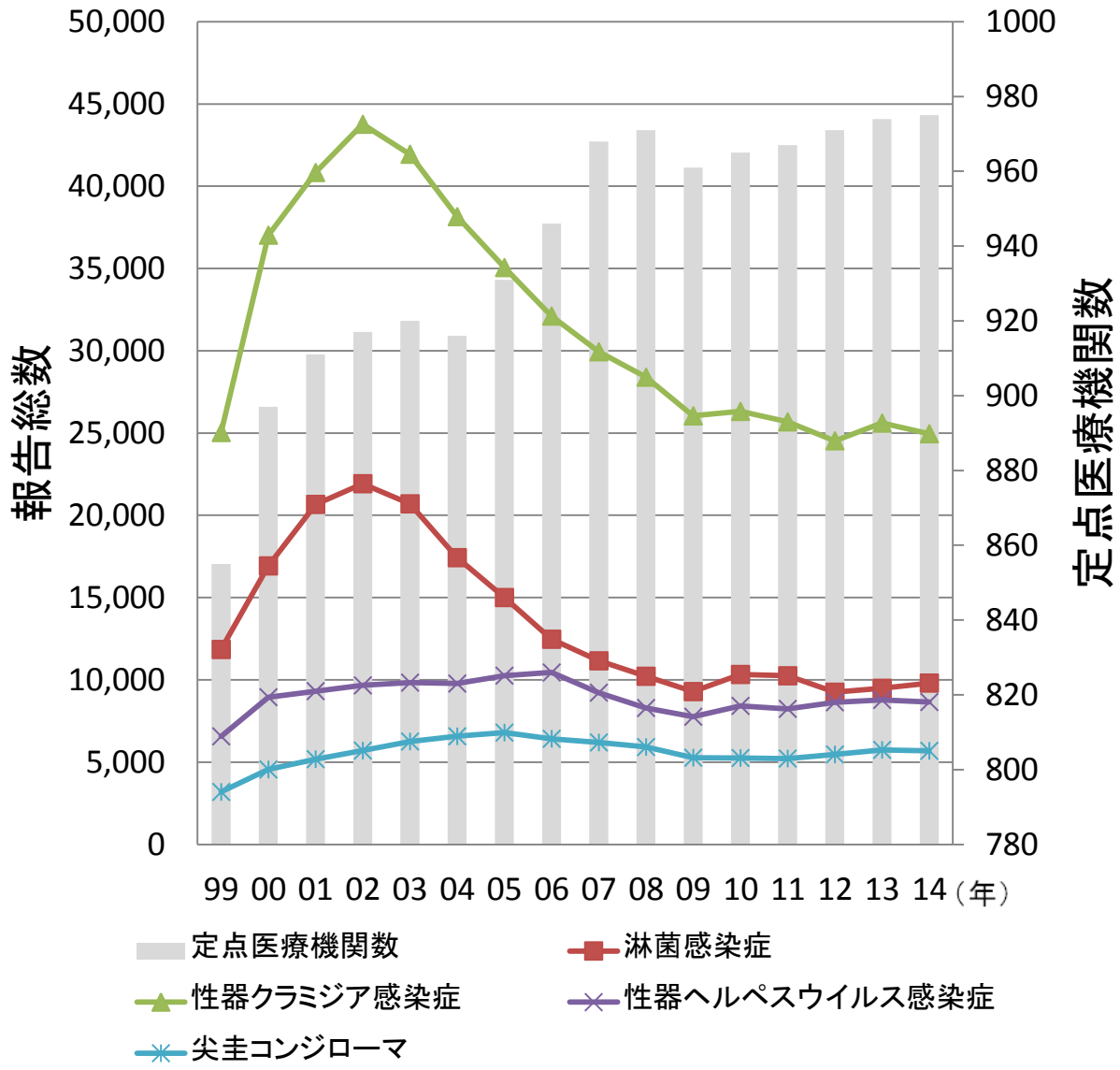


図 1　日本における性感染症報告数の年次推移

日本における性感染症の報告数（定点把握）の年次推移を示した。性感染症起因菌は 5 類感染症となっており、定点観測の感染症のみを示している（梅毒は全数調査のため除外した)。グラフは参考文献 24 を参考に作製した。

図 2

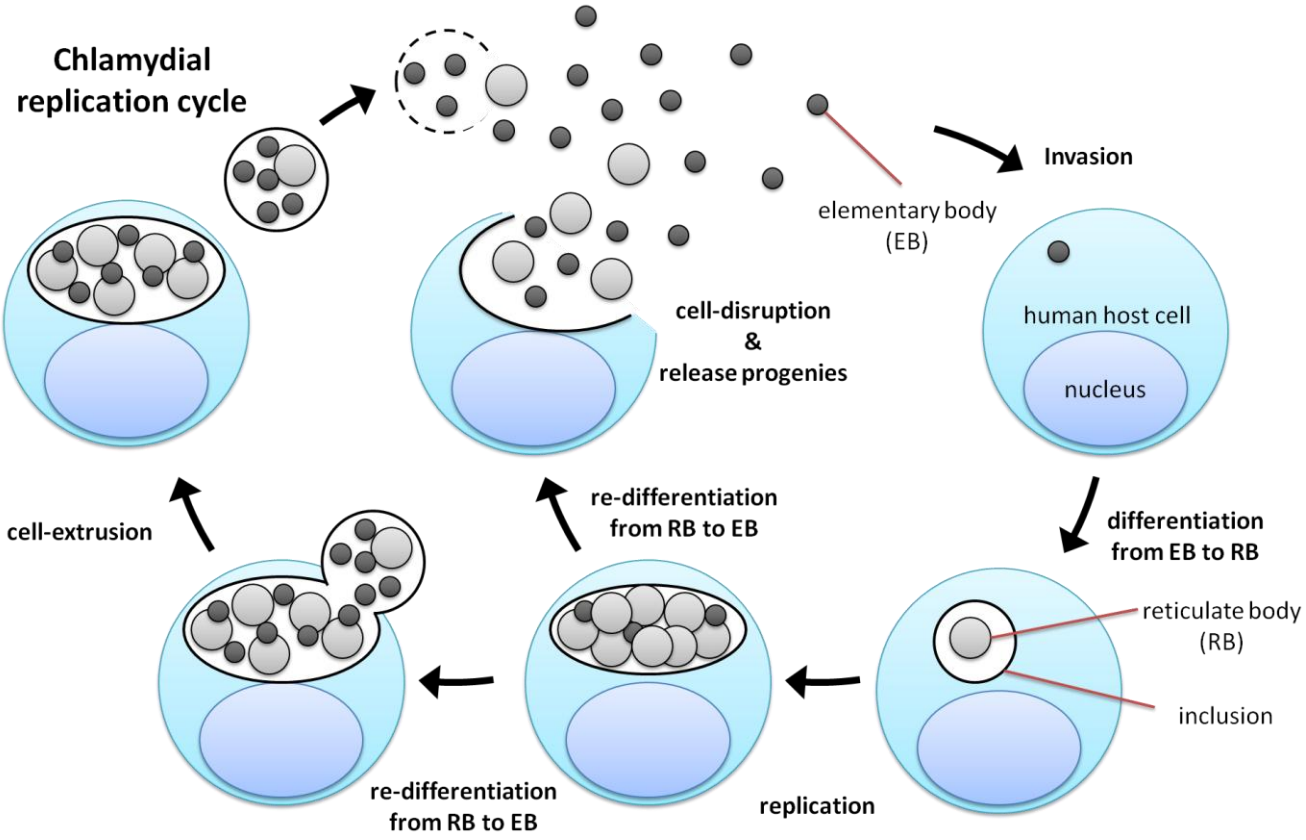


図 2　クラミジアの増殖環

クラミジアは基本小体（EB；elementary body）と網様体（RB；reticulate body）の 2 種類の形態をとり、宿主細胞内で増殖する。EB は宿主細胞に付着、侵入後、封入体（inclusion）を形成し、RB へと分化する。RB は 2 分裂増殖し、再び EB へと分化し、細胞を破壊することで宿主細胞外へと放出され（cell-disruption）、新たな細胞へと再感染する（中央）。また、封入体膜が細胞膜ごと突出し、宿主細胞を破壊せずに菌体を包んだ小胞が細胞外へ放出され（cell-extrusion）、その後菌体を細胞外へ放出する形で 2 次感染する可能性もある（左側）。

図 3

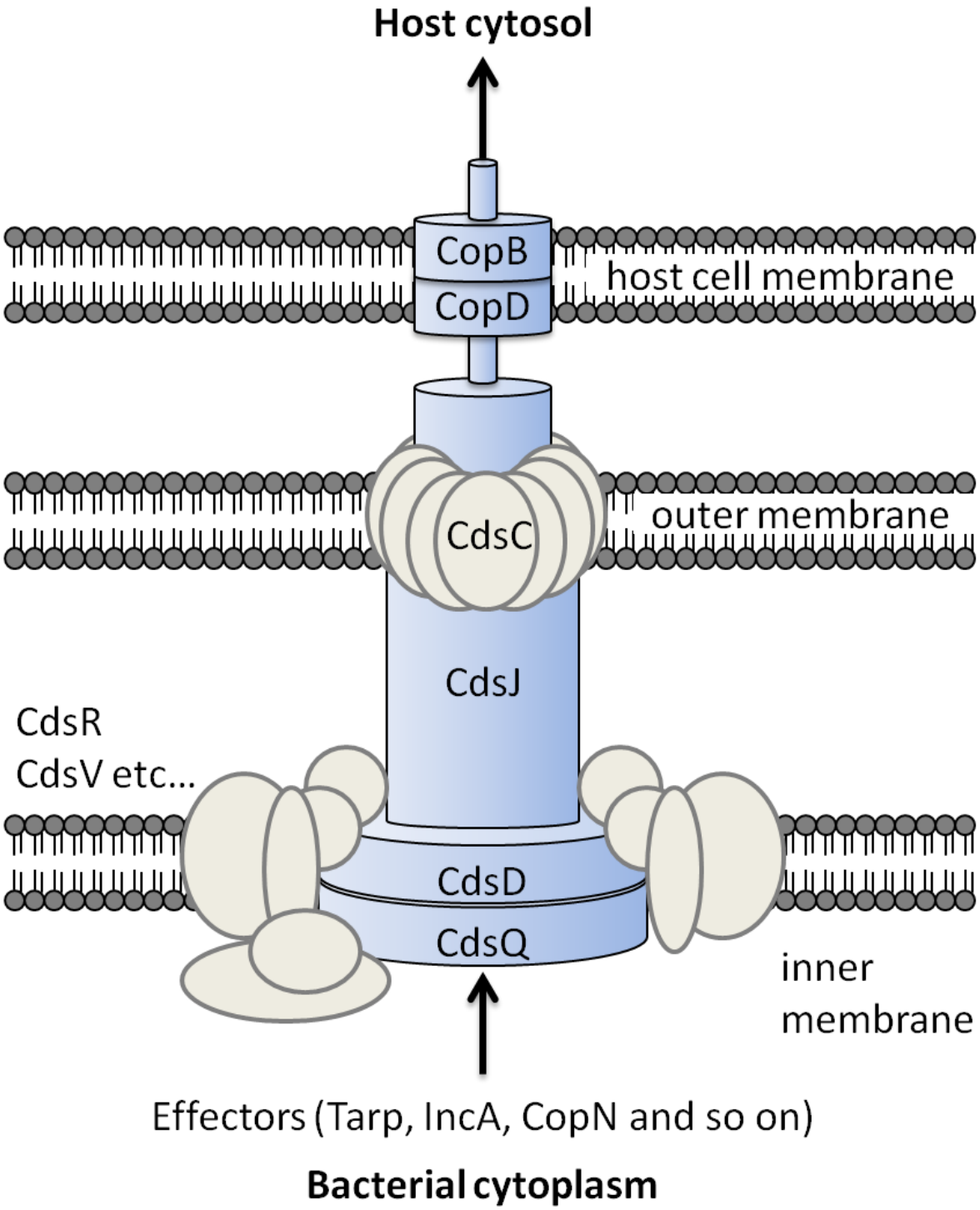


図 3　クラミジア III 型分泌装置の構造

　クラミジアの III 型分泌装置は菌体膜を貫いて細胞外へと突き出た針様構造をしている。クラミジア III 型分泌装置の各種構造タンパク質はエルシニアなどの III 型分泌装置とのタンパク質相同性解析などによって同定されている。図は参考文献 39 を参考に作製した。

表 2　病原性クラミジアのエフェクタータンパク質の種類と感染細胞内局在部位と宿主標的分子・機構

Effector*	**Species range**	**Intracellular localization**	**Host target**
Tarp	*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*	Cytosol	Actin
CT694	*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*	Cytosol	Ahnak
ChlaOTU	*C. pneumoniae*	Cytosol	NDP52/Ubiquitin
CopN	*C. pneumoniae*	Cytosol	tublin, aldrase A
IncA	*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*	Inclusion membrane	Endocytic SNAREs,
CT850	*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*	Inclusion membrane	Microtubule network
IncD	*C. trachomatis*	Inclusion membrane	CERT
IncG	*C. trachomatis*	Inclusion membrane	14-3-3-β
CT228	*C. trachomatis*	Inclusion membrane	Myosin phosphatase
CT229	*C. trachomatis*	Inclusion membrane	Rab4
CT813	*C. trachomatis*	Inclusion membrane	Vamp7, Vamp8
Cpn0585	*C. pneumoniae*	Inclusion membrane	Rab1, Rab10, Rab11
Cpn0517	*C. pneumoniae*	Inclusion membrane	Act1

*****病原性クラミジア（*C. trachomatis*：性器クラミジア, *C. pneumoniae*：肺炎クラミジア）の既知のエフェクター。参考文献 41 より一部抜粋し、参考文献 44 を参考に改変した。

図 4

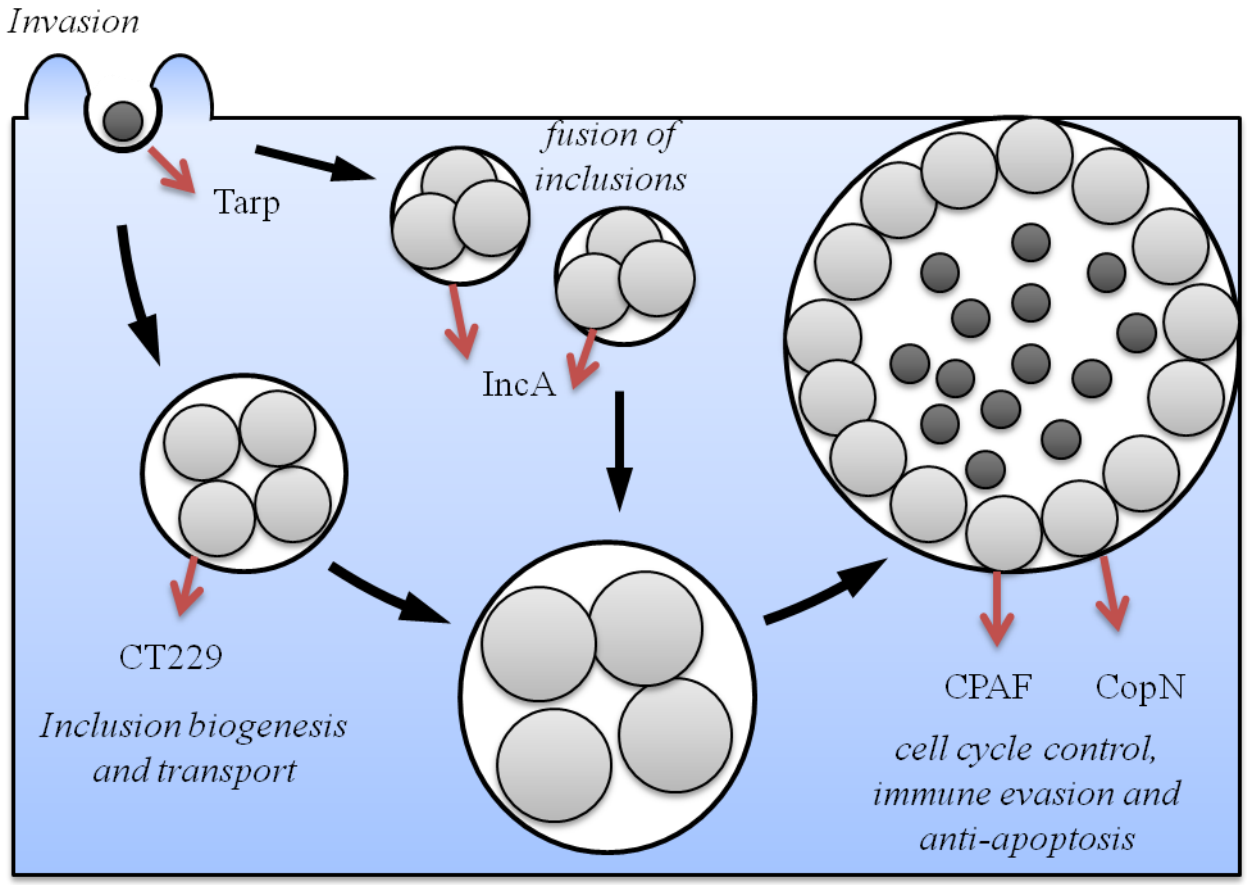


図 4　クラミジアエフェクタータンパク質の細胞修飾機構

クラミジアの増殖環の各時期における既知のエフェクタータンパク質の分泌とその役割を簡易的に示した。黒矢印は増殖環の推移を、赤矢印はエフェクタータンパク質の分泌を表している。立体で表現した文字はエフェクタータンパク質の名称を、斜体で表現した文字はエフェクタータンパク質の細胞修飾機構の内容を記載した。図は参考文献 39 と 40 を参考に作製した。

第 2 章

性器クラミジアとウレアプラズマの混合感染について

（論文掲載済：*Journal of Infection and Chemotherapy*. Volume 20, Issue 8, 2014, pp.460-464）

2-1　第 2 章概要

第 2 章では、女性生殖器粘膜面における細菌叢の存在が性器クラミジアの病態形成に与える影響について解析する。ウレアプラズマ（*Ureaplasma parvum*）は生殖器粘膜面に高頻度に存在する常在細菌であり、*Mycoplasmataceae* 科に属する細菌である。本科に属する *Mycoplasma genitalium* などは性器クラミジア感染の頻度を上昇させるリスク因子でもあるのかもしれないということが過去の報告で提言されている。そこで実際に、健常女性の膣中で高頻度に共感染するウレアプラズマの存在下で性器クラミジアの増殖能の変化を検討した。

我々の以前の研究で、札幌の市中病院を受診した健常妊婦の膣サンプルから遺伝子を抽出し、PCR にて性器クラミジアとウレアプラズマ、マイコプラズマの検出を行い、性器クラミジアとウレアプラズマの混合感染頻度が有意に高いことを明らかにした。このことから、ウレアプラズマの存在が性器クラミジアの増殖に何らかの影響を与えている可能性があるのではないかと思われた。それ故に、ウレアプラズマの存在下でヒト上皮系細胞株 HeLa 細胞に感染させた性器クラミジアの成熟分化に与える影響を、性器クラミジアに対する主要な生体内防御因子であるインターフェロン - ガンマ（IFN-γ）の存在、非存在下で検討した。その結果、IFN-γ 添加時に、ウレアプラズマが存在すると、IFN-γ によって抑制されるはずの性器クラミジアの増殖能が部分的に回復していることが分かった。また、この作用はウレアプラズマの熱処理死菌でも同様の効果が得られた。一方、ウレアプラズマの有無、あるいは生菌または死菌の添加によって、IFN-γ により発現が促進される Indoleamine 2,3-dioxygenase（IDO）の発現量に変化は認められなかった。これらのことは、IFN-γ が IDO の発現量を操作することとは独立して、ウレアプラズマが IFN-γ によって抑制される性器クラミジアの成熟を回復させている可能性が示唆された。この結果は、生体内の感染局所である膣の粘膜環境における IFN-γ に対する性器クラミジアの新たな生存戦略を示しているかもしれない。

2-2　緒言

性器クラミジアが主として感染する部位であるヒト女性膣環境には、多数の常在細菌や他の病原細菌が存在し、それらは代謝に有益性をもたらす分子の補い合いなどを通した複雑な生態系を形成している[1, 2]。しかしながら、これら細菌叢が性器クラミジアの生存に対してどのような影響を与えているのかはいまだ明らかになっていない。*Ureaplasma parvum*（以下、ウレアプラズマ）は、*Mycoplasmataceae* 科に属する細菌であり、生殖器粘膜面に高頻度に存在する常在細菌である[3-7]。我々の以前の研究で、札幌の市中病院に出生前検診に訪れた健康な女性の膣サンプルから性器クラミジアとウレアプラズマの混合感染が高頻度で確認された[8]。このことから、性器クラミジアとウレアプラズマの間には高頻度に混合感染する上で相互に利害関係を有する様な関係があると推察されたが、生殖器でウレアプラズマと同時に性器クラミジアを感染させた実験はこれまでなかった。

第 1 章でも記したように、性器クラミジアは、細胞に感染する際の基本小体と増殖形態の網様体、それらを含有する宿主細胞膜を利用した封入体といった、特徴的な 2 相性の増

殖サイクルを持つ。これら性器クラミジアに対するヒト生体内主要防御因子はインターフェロン - ガンマ（IFN-γ）であり、封入体内での RB から EB への成熟分化を阻害することが報告されている[9]。この阻害メカニズムに関しての研究は数多くなされており、IFN-γに暴露された細胞では Indoleamine 2,3-dioxygenase（IDO）の活性化に伴いキヌレニン代謝経路の主要な酵素が活性化されることで、トリプトファンの枯渇が引き起こされ、感染細胞中の性器クラミジアの分化が抑制される[10-14]。しかしながら、性器クラミジアの増殖を抑制する IFN-γ の効果がウレアプラズマによってどのような影響を受けうるのかは明らかではない。

そこで、本研究ではヒト上皮系細胞株 HeLa 細胞に感染させた性器クラミジアの増殖への、ウレアプラズマの共感染が、性器クラミジアの生体内主要防御因子 IFN-γ の効果に、与える影響について研究した。

2-3　対象と方法

2-3-1　ヒト培養細胞株

ヒト上皮系細胞株 HEp-2 細胞と HeLa 細胞は、それぞれ American type culture collection（ATCC； Manassas, VA, USA）と Riken cell bank（Tsukuba, Japan）より購入した。各培養細胞は、Dullbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM； Sigma, St. Louis, MO, USA）に 10%非働化済ウシ胎児血清（FCS）と 2 種類の抗菌薬［VA： vancomycin（10 μg/mL）, amphotericin B（0.5 μg/mL）（両方とも Sigma より購入 ）］を加えた培地を用い、5%CO_2、37℃条件下で培養した[15]。

2-3-2　性器クラミジアの準備

性器クラミジア *Chlamydia trachomatis* D/UW3 Cx 株は ATCC より購入し、HEp-2 細胞に感染増殖させ準備した。具体的には、感染後 2 日目の感染細胞を回収し、－80℃で一晩凍結後、解凍し細胞を融解することで性器クラミジアを培養液中に取り出し、細胞成分を遠心（300×g、5 分間）によって取り除いた後に、高速遠心（800×g、10 分間）により菌体ペレットを回収した。この菌体ペレットを Sucrose-phosphate-glutamic acid buffer（SPG；0.2 M Sucrose, 3.8 mM KH_2PO_4, 6.7 mM Na_2HPO_4, 5 mM L-glutamic acid）で懸濁し、使用時まで－80℃で保存した。性器クラミジアの感染粒子数（EB 数）は封入体形成法（IFU；Inclusion Forming Units）で測定した[16]。この方法では、まず－80℃で保存された性器クラミジア SPG 懸濁液を、96 穴プレートに単層調整した HEp-2 細胞に吸着感染（400×g、60 分間）させた。感染後、上清を 20%FCS 添加 DMEM に 3 種類の抗菌薬［GVA：gentamycin（10 μg/mL）, vancomycin（10 μg/mL）, amphotericin B（0.5 μg/mL）］を加えた培地に置き換え、5%CO_2、37℃条件下で培養した。48 時間後、感染細胞を 70%エタノールで 10 分間固定し、HEp-2 細胞内に形成された封入体を FITC 標識マウス抗クラミジア LPS モノクローナル抗体（Denka Seiken, Tokyo, Japan）で染色し、蛍光顕微鏡下で封入対数を算定し EB 数を算出した。

2-3-3　ウレアプラズマの準備

ウレアプラズマ *Ureaplasma parvum* 27813 株は ATCC より購入した。ウレアプラズマは Pleuro pneumonia-like organism（PPLO）培地［1.5%（w/v）マイコプラズマ基礎ブイヨン（Kanto Chemical, Tokyo, Japan）、20%（v/v）ウマ血清、2.5% 酵母抽出物、0.1%（w/v）尿素、0.005%（w/v）フェノールレッド、vancomycin（10 μg/mL）, amphotericin B（2 μg/mL）、pH 6.0］で増殖させた[17-19]。ウレアプラズマの生菌数の算定は、菌液を PPLO 寒天培地（PPLO 培地に 1%寒天添加）に塗布し 14 日間培養後、集落を落射実体顕微鏡を用いて算定した（CFU；Colony Forming Units）。熱処理菌は 85℃、30 分間、UV 処理菌は UV 照射器（UVP, Up-land, CA, USA）で 46800 μJ/cm^2 となるようそれぞれ処理した[20-22]。

2-3-4　感染実験

HeLa 細胞を 1×10^5/well で前培養し、性器クラミジアとウレアプラズマをそれぞれ感染多重度（MOI；multiplicity of infection）が 0.01-10 となるように添加し吸着感染した（400×g、60 分間、室温）。HeLa 細胞は感染 1 日前に IFN-γ（5 ng/mL）を添加したものと無添加のものを使用した。遠心後、上清を除去し、10%FCS 添加 DMEM（VA）（IFN-γ 添加・無添加）を加え、37℃、5%CO_2 で 2 日間培養した。培養後、感染細胞を回収し、IFU 法（2-3-2 参照）にて EB 数を算定し、IDO 発現量（2-3-5, 2-3-6 参照）を検討した[23, 24]。実験に使用した IFN-γ の濃度（5 ng/mL）は以前の報告を参考にし、性器クラミジアの増殖能に与える影響が十分に観察できる濃度として選択した[25]。

2-3-5　定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（quantitative reverse transcription polymerase chain reaction；qRT-PCR）法

感染または非感染細胞からの総 RNA の抽出には High Pure RNA Isolation Kit（Roche, Indianapolis, IN, USA）を使用した。抽出された RNA には DNase I（DNA-free；Ambion, Austin, TX, USA）を処理し、DNA を除去した。1 μg の総 RNA を ReverTraAce qPCR RT Master Mix（Toyobo, Osaka, Japan）を使い、逆転写反応により相補的 DNA（cDNA）を得た。そして、以下のプライマーを用いた PCR にて cDNA を増幅した（*ido1*：forward 5’ - CCT GAG GAG CTA CCA TCT GC -3’、reverse 5’ - TCA GTG CCT CCA GTT CCT TT -3’ [26]、*gapdh*：forward 5’ -AAC GGG AAG CTC ACT GGC ATG -3’、reverse 5’ - TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG -3’[27]）。PCR 条件は DNA 熱変性 90℃、10 分間反応後、40 サイクルの反応（熱変性：95℃、30 秒、アニーリング：60℃、30 秒、伸長：72℃、30 秒）によって行った。*ido1* の発現量は *gapdh* 量で標準化した。

2-3-6　ウエスタンブロッティング法

それぞれの条件で回収された HeLa 細胞は滅菌リン酸緩衝液で 3 回洗浄し、2-メルカプトエタノールを含む還元緩衝液に溶かした後、100℃で 5 分間反応させた。サンプルは 10%（w/v）SDS-PAGE を用いて、20 mA、80 分間泳動した。SDS-PAGE にて分離されたタンパク質は、エレクトロブロッティングにより二フッ化ポリビニリデン（PVDF）膜に転写した。

PVDF 膜は 5%（w/v）スキムミルクを加えた Tris リン酸緩衝液でブロッキングし、1 次抗体としてウサギ抗 IDO 抗体（Epitomics, Burlingame, CA）またはウサギ抗ヒト α-tubulin 抗体（Sigma）を室温で 1 時間反応させた後、2 次抗体としてセイヨウワサビーペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を室温で 1 時間反応させた。ウサギ抗ヒト α-tubulin 抗体は内部標準タンパク質 α-tubulin を染色するために使用した。標識蛋白は Pierce® Western Blotting Substrate（Thermo, Rockford, IL）で可視化した。

2-3-7　統計解析

データ間の比較解析には非対応の Student の *t* 検定を用いて行った。$p < 0.05$ を有意差ありとした。

2-4　結果

2-4-1　IFN-γ 存在下でのウレアプラズマ共感染が HeLa 細胞内で抑制された増殖サイクル中の性器クラミジアの感染粒子数を部分的に回復させた

IFN-γ は細胞内でのクラミジアの排除に直接的に関係する主要な宿主防御因子である[11-14] 。そこで、IFN-γ 存在下での性器クラミジアの増殖に対するウレアプラズマの存在が与える影響について実験した。蛍光染色像は、IFN-γ 存在下での性器クラミジアの封入体が、非存在下に比べ顕著に小さいことを示している［図 1（A）、（B）］。一方、ウレアプラズマ添加細胞では、抑制された封入体サイズは回復した［図 1（C）］。この現象は、ウレアプラズマの共感染時にはたとえ IFN-γ 存在下でもクラミジアが成熟分化できる可能性を示唆している。そこでこの仮説を確かめるために、我々は封入体形成単位（inclusion forming units：IFU）法を用いて、ウレアプラズマ共感染の有無で HeLa 細胞内での性器クラミジアの感染粒子（EB）数の変化を測定した。その結果、IFN-γ 存在下でのウレアプラズマ共感染は性器クラミジアの感染粒子数の明らかな増加を引き起こし、その推移はウレアプラズマの感染多重度（multiplicity of infection：MOI）に依存しているようだった （図 2）。一方で、IFN-γ 存在下での性器クラミジア感染粒子数（IFU 値/ml±標準偏差）の変化はウレアプラズマの生菌（MOI 1：$2.7\times10^5\pm4.9\times10^4$）と死菌（MOI 1 相当：$2.1\times10^5\pm3.8\times10^3$）において有意差はなかった。以上のことをまとめると、ウレアプラズマの細菌成分が共に存在することによって、IFN-γ によって HeLa 細胞内で抑制された増殖サイクルにおける性器クラミジアの成熟が部分的に回復するが、対照的に、IFN-γ 非存在下では、ウレアプラズマの共刺激によって性器クラミジアの増殖阻害効果が引き起こされることが明らかになった（図 2；Up MOI 1 without IFN-γ）。

2-4-2　ウレアプラズマの共感染は IFN-γ 存在下での HeLa 細胞の IDO 発現に影響を与えない

IFN-γ は IDO の活性化によるトリプトファンの消費に関与している[28]。IDO はヒト上皮細胞内でのキヌレニン代謝経路に必要不可欠な酵素であり、キヌレニン代謝経路の活性化は、細胞内でのクラミジアの増殖に絶対的に必要とされるトリプトファンの枯渇を引き起

こす[11-14, 29]。それゆえに、我々は qRT-PCR とウエスタンブロッティングを用いてウレアプラズマ刺激によって IFN-γ が存在する性器クラミジア感染細胞中での IDO の発現が変化するかどうかを調査した。驚くべきことに、IFN-γ 存在下でウレアプラズマの生菌や死菌の共刺激環境において IDO の遺伝子発現に変化はなかった［図 3（A)］。さらに、ウエスタンブロッティングによって IDO タンパク質発現にも変化がないことが確認され、qRT-PCR の結果を裏付けるものとなった［図 3（B)］。我々は、IFN-γ 存在、非存在下での HeLa 細胞内の IDO 発現について、ウレアプラズマ単独での影響についても調べたが、変化がないことが確認された（図 4)。このように、以上の結果は、性器クラミジアの成熟分化の回復作用に対するウレアプラズマ共刺激の効果が IDO の発現と独立して起こっていることを明示している。

2-5　考察

IFN-γ は細胞内でのクラミジアの排除に直接的に関係する主要な宿主因子である[11-14] 。本研究では、IFN-γ 存在下での性器クラミジアの増殖に対するウレアプラズマの存在が与える影響について検証した。蛍光染色像では、IFN-γ 存在下での性器クラミジアの封入体の大きさは縮小したが、ウレアプラズマの存在によって回復した（図 1)。また、性器クラミジアの EB 数（IFU 値）はウレアプラズマの MOI に依存して回復しているようだった。一方で、性器クラミジアの感染粒子数は、添加するウレアプラズマの生菌と死菌の間に有意差はなかった（図 2)。また、対照的に IFN-γ 非存在下では、ウレアプラズマの共刺激によって性器クラミジアの増殖阻害効果が引き起こされた（図 2)。以上の結果は、ウレアプラズマの細菌成分が共に存在することによって、IFN-γ によって HeLa 細胞内で抑制された増殖サイクルにおける性器クラミジアの成熟が部分的に回復するということを示している。

IFN-γ 非存在下においてウレアプラズマの存在は、性器クラミジアの細胞内増殖能を有意に抑制し（図 2：without IFN-γ)、ウレアプラズマの存在そのものが性器クラミジアの細胞内増殖を抑制していると考えられる。また死菌でも同じ様な抑制効果が認められたことより、ウレアプラズマ菌体成分による刺激が性器クラミジアの細胞内増殖に影響を与え、菌数の低下をもたらしたと考えられる。細胞培養環境では *Mycoplasma*（マイコプラズマ）のコンタミネーションがしばしば起こっており、マイコプラズマ刺激により細胞内でインターロイキン（IL）-1β、IL-6、IL-8 腫瘍壊死因子（TNF）α、単球走化性タンパク質（MCP）-1 やマクロファージ炎症性タンパク質（MIP）-1β 等のサイトカインの産生を介して、細胞の増殖や分化が阻害されることがある[17-19]。これは主にマイコプラズマのリポタンパク質が Toll 様受容体（TLRs）を介して核内因子 NF-κB の活性化を引き起こすためだと考えられている [19]。マイコプラズマ属の引き起こす複雑な細胞機能修飾は、感染細胞の ATP や脂質合成に依存する性器クラミジアの細胞内増殖に影響を与える可能性が高い。本研究は、性器クラミジアの 2 相性の増殖環の中で細胞への感染に特化した感染粒子である EB の数を指標としているので、IFN-γ 非存在下でのウレアプラズマの存在は、性器クラミジアの細胞内での RB から EB への分化誘導を抑制すると考えられた。一方、細胞内の RB 菌体は様々

な細胞刺激でさらに異型体（AB：aberrant body）という特異な形態に移行する[9]。AB は、分裂能が欠落しているが、ゲノムの複製能力は温存しており、ステロイドなどの刺激で容易に再活性化することが可能な、細胞内休眠型菌体である。活発に増殖することで生体内防御機構の過剰な活性化を誘導し排除されてしまう可能性があるため、AB は生体内で性器クラミジアが長期間生存する上で極めて有効な形態である[9, 11-12]。それ故に、IFN-γ 非存在下でのウレアプラズマ菌体刺激による性器クラミジアの細胞内増殖抑制は、性器クラミジアが生殖器粘膜面で宿主に認識されずに生存し続ける上で大きな役割を演じている可能性がある。

クラミジアは TLRs からの刺激依存的に増殖が抑制されるが、IFN-γ 刺激によって TLRs からのシグナルはキャンセルされることが報告されている[30]。一方で、IFN-γ は IDO の活性化により、ヒト上皮細胞内でのキヌレニン代謝経路を活性化し、クラミジアの増殖に必要不可欠な細胞内トリプトファンの枯渇を誘導する[11-14, 29]。しかしながら、IFN-γ 存在下でウレアプラズマの生菌や死菌の共刺激環境において、IDO の遺伝子発現と IDO タンパク質発現にも変化がないこと（図 3）に加えて、ウレアプラズマ単独でも IDO の発現に変化がないことが確認された（図 4）。以上の結果から、ウレアプラズマ共刺激による性器クラミジア増殖能の回復作用に対する効果は IFN-γ による IDO の発現と独立して起こっていると示唆される。また、過去の報告で *U. urealyticum*（*U. parvum* 近縁種）のゲノム配列上にはトリプトファンの合成経路がないことが明らかとなっていて[31]、死菌でも生菌と同様の効果が得られたことから、ウレアプラズマのこの効果がトリプトファンを合成することによる栄養の供給ではないと考えられる。

このように、IFN-γ 非存在下では対照的だが、ウレアプラズマの生菌や死菌の共培養は IFN-γ 存在下で抑制された増殖サイクルから性器クラミジアの増殖能の回復を導く。この回復効果の分子メカニズムはまだ明らかになっていないが、最も考えられる可能性は、性器クラミジア感染細胞にウレアプラズマが取り込まれ分解され、性器クラミジアに対するトリプトファンを作り出す栄養源となっているのかもしれない。近年の共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた報告では、ヒト上皮系細胞 HEp-2 細胞への *U. diversum*（*U. parvum* の近縁種）の侵入を証明していて、我々の仮説を支持している[32]。女性生殖器には多数の常在細菌がおり、性器クラミジアは IFN-γ 存在下であっても他の常在細菌から補完的にインドールを獲得することによってトリプトファンを補完し生殖器粘膜面で生存することができる[24]。それ故に、性器クラミジアが宿主生体内防御因子 IFN-γ 暴露から逃れるために様々な戦略を進化させてきたことを暗示している。いくつかの研究では、女性生殖器で性器クラミジアの存在と *M. genitalium* など他の *Mycoplasma* 属の存在が明らかに相関していること報告している[33, 34]。それ故に、今回我々が報告したウレアプラズマと同様に、*M. genitalium* が性器クラミジア感染の頻度を上昇させるリスク因子である可能性が示唆されている[33, 34]。このように、ウレアプラズマ刺激によって促進される女性生殖器粘膜面でのクラミジアの生存性に関わる新規戦略の発見は、微生物間相互作用の研究に対する有意な推察への新たな知見を与えた。

2-6　結論

我々は、ウレアプラズマ共培養が IFN-γ 存在下での HeLa 細胞内での性器クラミジアの感染粒子数の増加を助けること、またそれが IDO 発現とは独立していることを発見した。このことは、女性生殖器で IFN-γ 暴露環境下において粘膜面で新たな宿主細胞への 2 次感染を促進することで長期間生き残り増殖することができるという、性器クラミジアの新規生存戦略の存在を示唆している。

2-7　参考文献

1. Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP (2011) The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG*. 118:533-549.
2. Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P (2007) Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 21:347-354.
3. Marrazzo JM (2005) Mucopurulent cervicitis: no longer ignored but still misunderstood. *Infect Dis Clin N Am*. 19:333-349.
4. Lusk MJ, Konecny P (2008) Cervicitis: a review. *Curr Opin Infect Dis*. 21:49-55.
5. Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL (2000) Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microbiol*. 38:1175-1179.
6. Kong F, James G, Ma Z, Gordon S, Wang B, Gilbert GL (1999) Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum* support for the establishment of a new species *Ureaplasma parvum*. *Int J Syst Bacteriol*. 49:1879-1889.
7. Kong F, Zhu X, Wang W, Zhou X, Gordon S, Gilbert GL (1999) Comparative analysis and serovar-specific identification of multiple-banded antigen genes of *Ureaplasma urealyticum* biovar 1. *J Clin Microbiol*. 37:538-543.
8. Yamazaki T, Matsumoto M, Matsuo J, Abe K, Minami K, Yamaguchi H (2012) Frequency of *Chlamydia trachomatis* in *Ureaplasma*-positive healthy women attending their first prenatal visit in a community hospital in Sapporo, Japan. *BMC Infect Dis*. 12:82.
9. Betty WL, Morrison RP, Byrne GI (1994) Persistent Chlamydiae: from cell culture to a paradigm for *Chlamydial* pathogenesis. *Microbiol Rev*. 58:686-699.
10. Omsland A, Sager J, Nair V, Sturdevant DE, Hackstadt T (2012) Developmental stagespecific metabolic and transcriptional activity of *Chlamydia trachomatis* in an axenic medium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:19781-19785.
11. Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP, Byrne GI (1994) Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated *Chlamydial* persistence. *Infect Immun*. 62:3705-3711.
12. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI (1995) Reactivation of persistent *Chlamydia trachomatis* infection in cell culture. *Infect Immun*. 63:199-205.
13. Pantoja LG, Miller RD, Ramirez JA, Molestina RE, Summersgill JT (2001) Characterization of

Chlamydia pneumoniae persistence in HEp-2 cells treated with gamma Interferon. *Infect Immun*. 69:7927-7932.

14. Nelson DE, Virok DP, Wood H, Roshick C, Johnson RM, Whitmire WM (2005) *Chlamydial* IFN-g immune evasion is linked to host infection tropism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:10658-10663.
15. Roblin PM, Dumornay W, Hammerschlag MR (1992) Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumonia*. *J Clin Microbiol*. 30:1968-1971.
16. Kubo T, Ishida K, Matsuo J, Nakamura S, Hayashi Y, Sakai H (2012) *Chlamydia trachomatis* serovar L2 infection model using human lymphoid Jurkat cells. *Microb Pathog*. 53:1-11.
17. Stanbridge E (1971) *Mycoplasmas* and cell cultures. *Bacteriol Rev*. 35:206-227.
18. He J, You X, Zeng Y, Yu M, Zuo L, Wu Y (2009) *Mycoplasma genitalium*-derived lipid associated membrane proteins activate NF-kB through toll-like receptors 1, 2, and 6 and CD14 in a MyD88-dependent pathway. *Clin Vaccine Immunol*. 16:1750-1757.
19. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K (2011) Cytoadherence-dependent induction of inflammatory responses by *Mycoplasma pneumoniae*. *Immunology*, 133:51-61.
20. Grenabo L, Brorson JE, Hedelin H, Pettersson S (1985) Concrement formation in the urinary bladder in rats inoculated with *Ureaplasma urealyticum*. *Urol Res*. 13:195-198.
21. Chelmonska-Soyta A, Miller RB, Ruhnke L, Rosendal S (1994) Activation of murine macrophages and lymphocytes by *Ureaplasma diversum*. *Can J Vet Res*. 58:275-280.
22. Kaufman JE, Christensen JF (1981) IES Lighting Handbook: Application volume 19-16, *Illuminating Engineering Society of North America*.
23. Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP (1993) Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:3998-4002.
24. Caldwell HD, Wood H, Crane D, Bailey R, Jones RB, Mabey D (2003) Polymorphisms in *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. *J Clin Invest*. 111:1757-1769.
25. Morrison RP (2000) Differential sensitivities of *Chlamydia trachomatis* strains to inhibitory effects of gamma interferon. *Infect Immun*. 68:6038-6040.
26. Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB (2010) Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNF-alpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One*, 5:e9016.
27. Gnoatto N, Lotufo RFM, Matsuda M, Penna V, Marquezini MV (2007) Expression of cell-surface heparan sulfate proteoglycans in human cyclosporin-induced gingival overgrowth. *J Periodont Res*. 42:553-558.
28. Morrison RP (2003) New insights into a persistent problem -- chlamydial infections. *J Clin Invest*. 111:1647-1649.
29. Taylor MW, Feng GS (1991) Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J*. 5:2516-2522.

30. Hu X, Chung AY, Wu I, Foldi J, Chen J, Ji JD (2008) Integrated regulation of toll-like receptor responses by Notch and interferon-gamma pathways. *Immunity*, 29:691-703.
31. Glass JI, Lefkowitz EJ, Glass JS, Heiner CR, Chen EY, Cassell GH (2000) The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature*, 407:757-762.
32. Marques LM, Ueno PM, Buzinhani M, Cortez BA, Neto RL, Yamaguti M (2010) Invasion of *Ureaplasma diversum* in Hep-2 cells. *BMC Microbiol*. 10:83.
33. Svenstrup HF, Dave SS, Carder C, Grant P, Morris-Jones S, Kidd M (2014) A cross-sectional study of *Mycoplasma genitalium* infection and correlates in women undergoing population-based screening or clinic-based testing for *Chlamydia* infection in London. *BMJ Open*. 4:e003947.
34. Hitti J, Garcia P, Totten P, Paul K, Astete S, Holmes KK (2010) Correlates of cervical *Mycoplasma genitalium* and risk of preterm birth among Peruvian women. *Sex Transm Dis*. 37:81-85.

第 2 章図
図 1

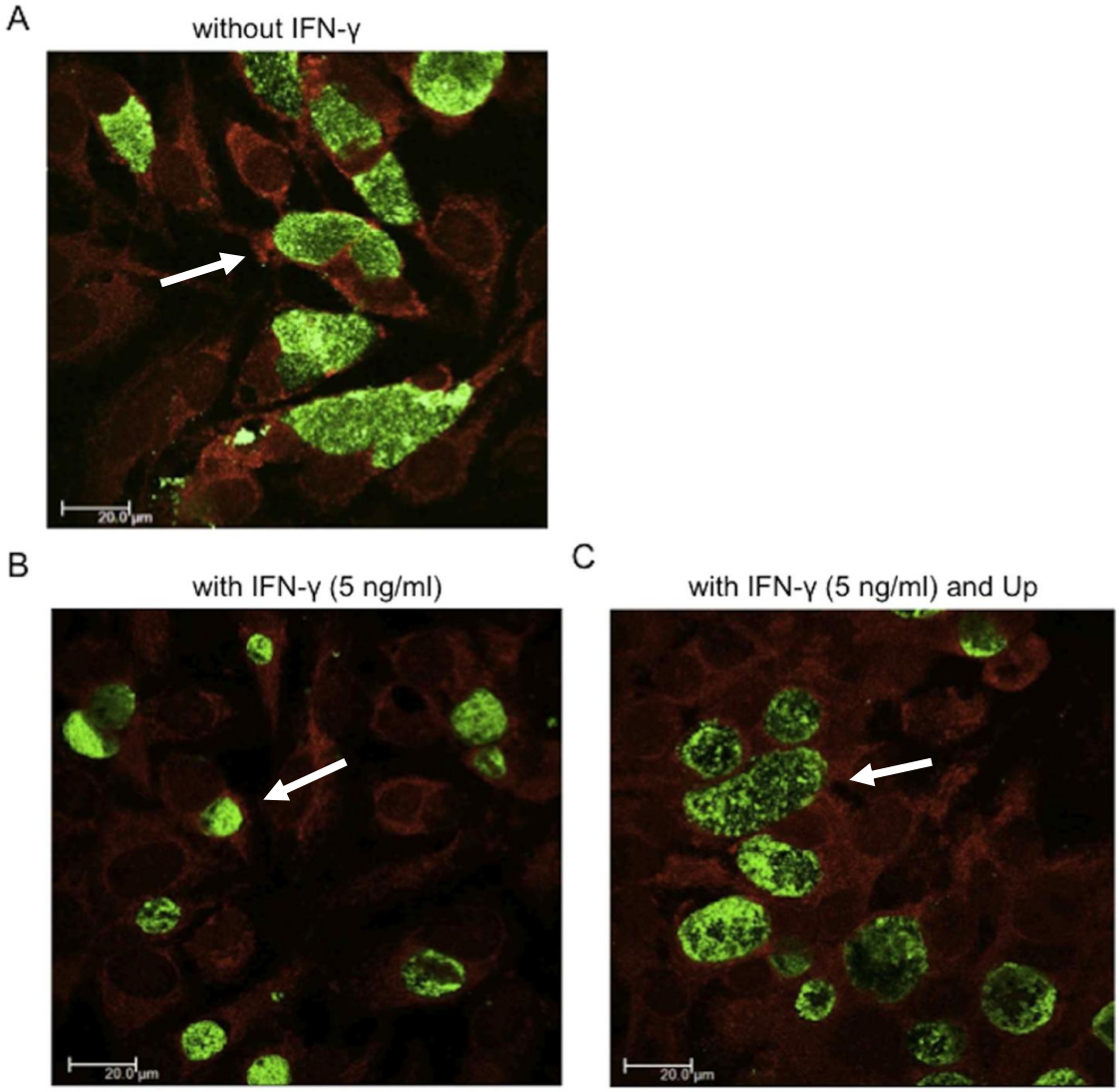


図 1　IFN-γ 存在・非存在下でのウレアプラズマ共感染時におけるクラミジア封入体の蛍光顕微鏡像

性器クラミジア（MOI 1）は、IFN-γ の存在・非存在下でウレアプラズマ生菌（MOI 10）を添加・非添加で感染させた。IFN-γ 存在下での実験では、HeLa 細胞には性器クラミジア感染 1 日前から IFN-γ を加えて前培養した。感染細胞は感染後 2 日目で固定し、エバンスブルー含有 FITC 標識マウス抗クラミジア LPS モノクローナル抗体で染色した。（A）IFN-γ 未添加の陰性対照“without IFN-γ”、（B）IFN-γ 存在下でのクラミジア封入体像 “with IFN-γ (5 ng/ml)”、（C）ウレアプラズマ共感染時の IFN-γ 存在下でのクラミジア封入体像 “with IFN-γ (5 ng/ml) and Up”。矢印は代表的な封入体像。

図 2

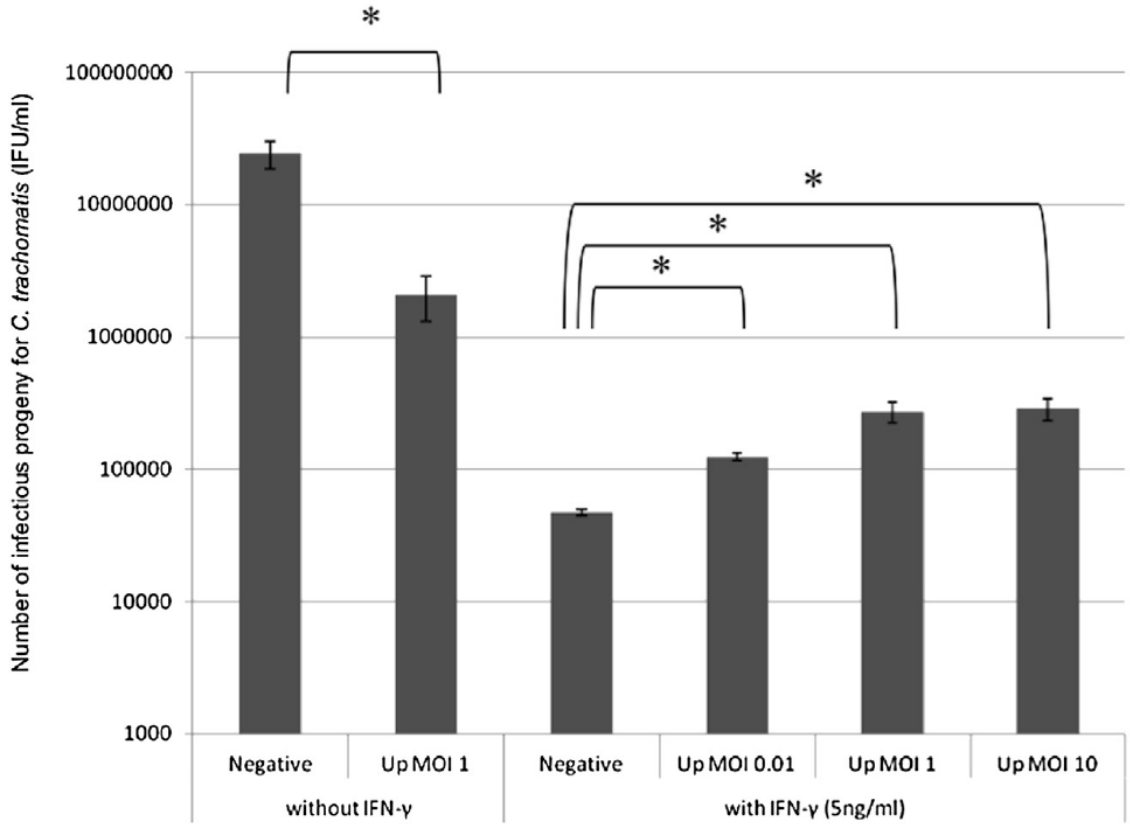


図 2　ウレアプラズマ共感染によって性器クラミジアの IFN-γ による HeLa 細胞内での増殖抑制からの回復

性器クラミジア（MOI 1）を IFN-γ 存在・非存在下でウレアプラズマ生菌（MOI 0.01-10）を添加・非添加で 48 時間感染させた。IFN-γ 存在下での実験では、HeLa 細胞には性器クラミジア感染 1 日前から IFN-γ を加えて前培養した。性器クラミジアの感染粒子数（Number of infectious progeny）の算定には IFU 法を用いた。＊：$p < 0.05$ をウレアプラズマ非存在下の陰性対照（Negative）との有意差ありとした。Up：ウレアプラズマ（*U. parvum*）

図 3

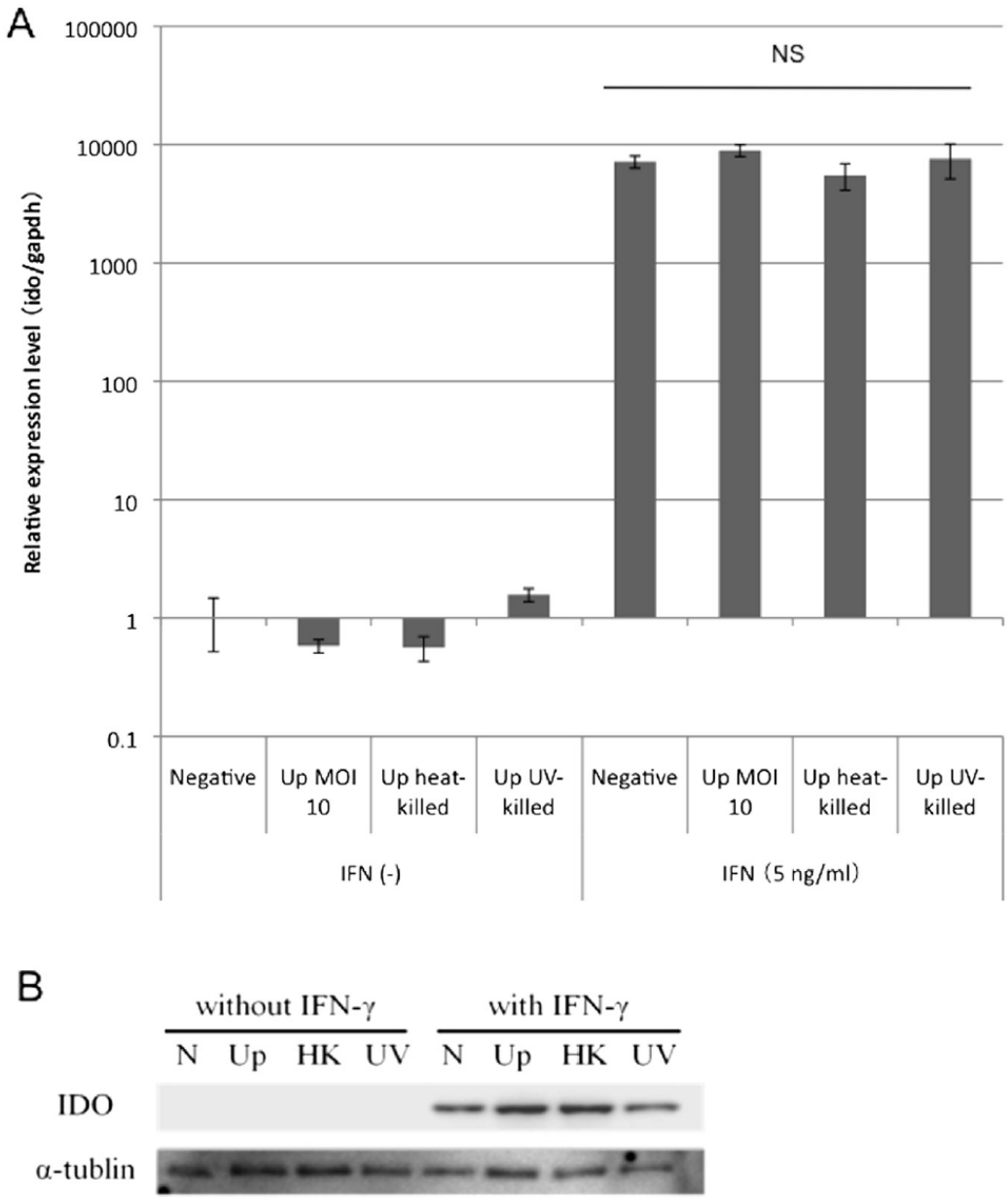


図 3　ウレアプラズマ共培養は IFN-γ 存在下での IFO 発現に影響を与えない

性器クラミジア（MOI 1）を IFN-γ 存在・非存在下でウレアプラズマ生菌（MOI 10）を添加・未添加で感染させた。IFN-γ 存在下での実験では、HeLa 細胞には性器クラミジア感染 1 日前から IFN-γ を加えて前培養した。（A）IFN-γ 存在・非存在下でウレアプラズマが添加・未添加の場合での *ido* 遺伝子発現の変化を qRT-PCR を用いて測定した。*ido* 遺伝子発現量は *gapdh* 遺伝子発現量で標準化した（ido/gapdh）。IFN-γ 非存在下での陰性対照（IFN(-) の Negative）の平均値の値を 1 とした相対値で表現している。NS：有意差なし（not significant）（B）ウエスタンブロッティングでの IDO タンパク質の発現変化を示している。α-tublin：内部標準。Up：ウレアプラズマ（*U. parvum*）。HK：ウレアプラズマ熱処理死菌。UV：ウレアプラズマ UV 処理菌。IFN：IFN-γ。IFN（-）：IFN-γ 未添加。

図 4

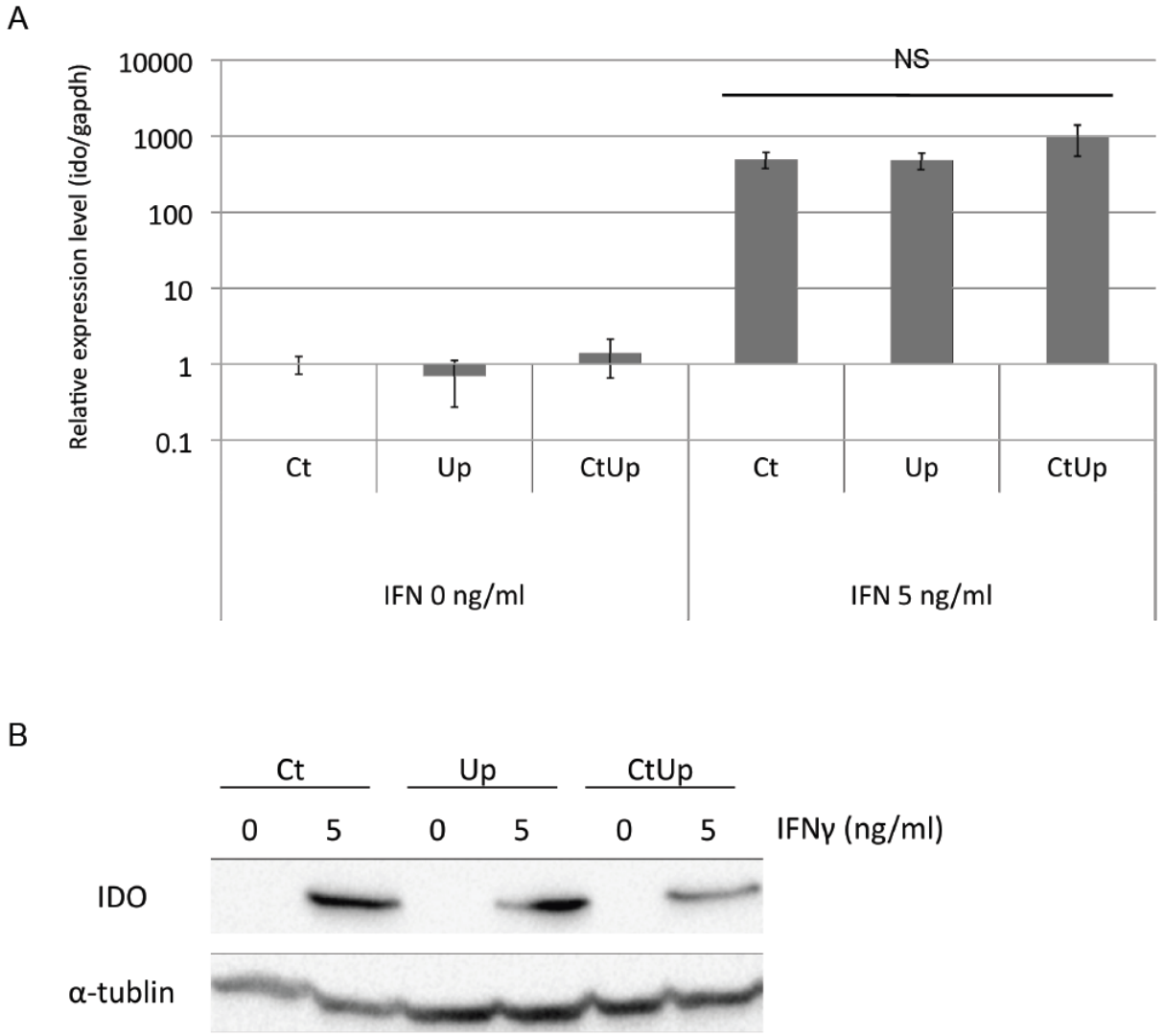


図 4　ウレアプラズマ刺激のみでも INF-γ 存在下で IDO 発現に影響を与えない。
IFN-γ 存在下での実験では、HeLa 細胞には性器クラミジア感染 1 日前から IFN-γ を加えて前培養した。（A）IFN-γ 存在・非存在下で性器クラミジア単独、ウレアプラズマ単独、性器クラミジアとウレアプラズマの混合感染のそれぞれでの *ido* 遺伝子発現の変化を定量 RT-PCR を用いて測定した。*ido* 遺伝子発現量は *gapdh* 遺伝子発現量で標準化した。IFN-γ 非存在下での性器クラミジアのみを感染させた細胞（IFN 0 ng/ml の Ct）の平均値の値を 1 とした相対値で表現している。NS：有意差なし（not significant）（B）ウエスタンブロッティングでの IDO タンパク質の発現変化を示している。α-tublin：内部標準。Ct：性器クラミジア MOI 1（*C. trachomatis*）Up：ウレアプラズマ MOI 10（*U. parvum*）。CtUp：性器クラミジアとウレアプラズマの混合感染。

第 3 章

性器クラミジア男性生殖器分離株の

多型性外膜タンパク質 PmpF の特徴とドラフトゲノム解析

（論文掲載済：*Journal of Infection and Chemotherapy*. volume 21, issue 12, 2015, pp.842–848、
Genome Announcements. volume 3 number 5, 2015, e01242-15）

3-1　第 3 章概要

性器クラミジアによる性感染症は男性と女性の双方ともに引き起こされるが、女性生殖器は生理学的かつ解剖学的に男性泌尿生殖器と異なっており、細菌表面分子の特異的変異を導く可能性がある。それ故に本研究では、日本の男性泌尿器から分離された性器クラミジア株（Japan-males, n＝12）の高度に定義された系統学的マーカーである多型性外膜タンパク質（polymorphic outer membrane protein：Pmp）F を解析し、これらの株群と日本の女性膣頸管部から分離された株群（Japan-females, n＝11）、日本国外の女性膣頸管部から分離された株群（Ref-females, n＝12）、日本国外の同性愛男性の直腸から分離された株群（Ref-males, n＝7）のそれぞれを Multiple Alignment using Fast Fourier Transform（MAFFT）ソフトウェアを一般的な生物情報解析ツールとして使用し、複数のアミノ酸配列の類似領域を特定できるように並べ（アライメント）、アミノ酸配列の保存性と同一性を比較した。その結果、これらの株群に属する性器クラミジアの PmpF アミノ酸配列の系統解析の再構築は 3 つの異なる配列保存性を持つクラスターに分類され、Japan-males 群はクラスター1 とクラスター2 に分類された（全く異なる 4 つ目のクラスターにはアウトグループのみが含まれた）。PmpF はカルボキシ末端に β-バレル構造を持ち菌体膜に埋め込まれ、アミノ末端側のパッセンジャードメインが菌体外に露出し、2 つの間をヒンジ部が架橋している様な構造をとる。一方で、PmpF のヒンジ部を除くパッセンジャードメインの系統学的な距離値（phylogenetic distance values）は、全長では有意差は存在しないが、Japan-males 群が最も PmpF アミノ酸配列保存性が高く、他の群に比べて多型性が少ないことが分かり、このことは配列保存性によって支持されている。このように、PmpF パッセンジャードメインは有用な系統学的マーカーであり、その系統学的特徴は日本の男性泌尿器から分離された性器クラミジア株がユニークかもしれないことを示しており、性器クラミジアが、常在細菌の存在の有無や性差などの環境選択因子の変化に対して、柔軟に適応できる能力を備えている可能性を示唆している。また、性器クラミジア No.54 は男性泌尿生殖器から分離された株でありながら、眼疾患株に特有な血清型を持つ株であり、十分に培養増殖可能であったため、ドラフトゲノム解析を行った。得られたドラフトゲノム情報から Pmp ファミリータンパク質をコードする遺伝子に対して、既知の性器クラミジア株との比較解析を行ったところ、*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が、性器クラミジアの遺伝子多型を誘導している可能性が示唆された。

3-2　緒言

偏性細胞内寄生性細菌性器クラミジアは、女性では卵管障害、骨盤内炎症性疾患、卵管閉塞など、男性では睾丸の萎縮、副睾丸炎、睾丸炎などに加えて不妊をも引き起こす深刻な合併症を導く性感染症の原因菌である[1-6]。クラミジア生殖器感染症は男性と女性ともに起こる。しかしながら、常在細菌を有している女性膣環境は細菌叢を持たない男性の泌尿器の環境とは生理学的かつ解剖学的に異なっており[7]、性差に依存した性器クラミジア株の細菌表面分子の特異的な変化を導く可能性が考えられる。現在まで、性器クラミジアの細菌としての特徴の主要な研究の多くは、女性から分離された株に焦点が当てられてき

た。その一方で、男性の泌尿器から分離された性器クラミジアに関する研究は、男性泌尿生殖器からの組織検体採取に侵襲性を伴うことと、細胞培養を継続的に必要とする性器クラミジアの分離の難しさによって邪魔されてきた。

性器クラミジアの多型性外膜タンパク質（polymorphic membrane protein：Pmp）は9つ（A-I）存在しており、高分解能を持つ系統学的マーカーとしての有用性が報告されている [8-13]。Pmps ファミリーに含まれるタンパク質は一般的に V 型分泌装置のエフェクタータンパク質としての性質を持っている。Pmps ファミリータンパク質のアミノ酸配列は、細胞質膜を通過するために必要な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-バレルドメインに加え、β-バレル構造によって形成される孔を通過して菌体外に露出するパッセンジャードメイン、β-バレルドメインとパッセンジャードメインを架橋するヒンジ部を含んでいる（図 4、最上段模式図） [14]。それ故に、Pmps タンパク質分子の菌体外に露出している部分が、常在細菌の様な宿主の選択圧に強く暴露し続けている可能性がある[15]。実際に、*pmp* 遺伝子の系統学的研究は遺伝子とタンパク質レベルで性器クラミジアの PmpF で大きな遺伝子多様性を示すことを報告している[13, 16]。

それ故に、本研究では日本で男性泌尿生殖器から分離された性器クラミジアの PmpF の多型性について調査し、日本の女性膣頸管部や海外の同性愛男性の直腸から分離された株と比較し、基本的な生物情報解析ツールとして Multiple Alignment using Fast Fourier Transform（MAFFT）ソフトウェアを用いて複数のアミノ酸配列の類似領域を特定できるように並べ（アライメント）、アミノ酸配列の保存性と同一性を比較した。また、性器クラミジア No.54 は男性泌尿生殖器から分離された株でありながら、眼疾患株に特有な血清型を持つ株であり、十分に培養増殖可能であったため、ドラフトゲノム解析を行ない、得られたドラフトゲノム情報から Pmps ファミリータンパク質をコードする遺伝子に対して、既知の性器クラミジア株との比較解析を行った。

3-3　対象と方法

3-3-1　細菌と PmpF アミノ酸配列情報

本研究には、性器クラミジア 42 株の PmpF アミノ酸配列を使用した。これらには日本の男性泌尿生殖器分離株（Japan-males, n＝12）、日本の女性膣頸管部分離株（Japan-females, n＝11）、文献報告から参照した日本国外の同性愛男性直腸分離株（Ref-males, n＝7）と女性膣頸管部分離株（Ref-females, n＝12）が含まれている。これについて、我々は Japan-female 群は Japan-male 群の *ompA* 遺伝子型が近い株を選択した。まず初めに、日本の男性泌尿器から分離された性器クラミジア 19 株を日本科学療法学会、日本感染症学会、臨床微生物学会の 3 つの学会から構成される日本サーベイランス委員会（東京、日本）より購入した。一方で、これらの株の内 HEp-2 細胞で培養可能であった 12 株（Strain numbers : 54, 404, 414, 419, 440, 441, 519, 520, 626, 627, 664, 687）を以降の実験に使用した（Japan-males）[17]。参考文献の同性愛男性株群として、過去に報告のあった 7 株の男性直腸分離株（Strain numbers：70, 150, 2923, 6276, 9301, 9768, 11023, 11074, 11222）を本実験に用いた[18]。さらに、女性株群として、本研究室の以前の研究で札幌より分離された 11 株（Strain

designations：nv266, nv283, nv287, nv307, nv381, nv399, nv441, nv417, nv437, nv443, nv448）[19]（Japan-females）と参考文献の日本国外の女性分離株（Strain designations：CS-431/04, I-174, I-149, I-24, CS-190/96, I-139, CS-121/96, CS-490/95, S-91, 537C-05, S-141, CS-500-96）[11, 16]（Ref-females）を本研究に使用した。本研究で使用した全株の登録番号と起源は表 1 にまとめた。図 1 では日本で分離された株の分離場所の違いを地図情報にまとめた。

3-3-2　細菌培養条件

性器クラミジア株は HEp-2 細胞で培養し、培養液には 20％ウシ胎児非働化血清含有 DMEM に抗菌薬（10 μg/ml gentamicin, 10 μg/ml vancomycin and 0.5 μg/ml amphotericin B（Sigma, St. Louis, MO, USA））を加えた培地を使用した[17]。簡潔に説明すると、感染細胞を感染 48 時間後に回収し、－80℃で保存、凍結融解して 400×g で細胞残渣を取り除き、細菌菌体を 9000×g で遠心回収した。回収した細菌はスクロース - リン酸 - グルタミン酸緩衝液（SPG：0.2 M sucrose, 3.8 mM KH_2PO_4, 6.7 mM Na_2HPO_4 and 5 mM L-glutamic acid）で再懸濁した。細菌は使用するまで－80℃に保存した。

3-3-3　系統学的同定解析、配列同一性と保存性の分析

ompA と *pmpF* 配列の決定のために、細菌のゲノム DNA を High Pure PCR Template Preparation Kit（Roche, Indianapolis, IN）を用いて抽出した。抽出はメーカーのプロトコルの指示に従った。抽出した DNA は High-Fidelity Phusion DNA polymerase（Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA, USA）と *ompA* と *pmpF* に特異的なプライマーセットを用いて増幅した[13,18]。このプライマーセットは表に示した（表 2）。増幅産物はアガロースゲル電気泳動によって分離し、エチジウムブロマイド（EtBr）によって可視化した。増幅産物をゲルごと切り出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics, Tokyo, Japan）を用いて、メーカーのプロトコル通りにゲルから抽出した。ゲル抽出した増幅産物は Macrogen（Macrogen, Seoul, South Korea）に委託し遺伝子配列を解析した。得られた全ての遺伝子配列は日本 DNA データバンク（DNA Data Bank of Japan：DDBJ、国立遺伝学研究所、静岡、日本）に登録した（表 1）。系統学的解析は、対比距離の算定や配列の同一性解析や保存性解析も含めて、MAFFT version 7 software（http:// mafft.cbrc.jp/alignment/software/）を用いて行った[20]。系統学的解析のために、4 種の性器クラミジア（血清型 L1-L3）株（登録番号: AY887659, AY887660, AY887661, AY887662）を Out-group として使用した。

3-3-4　PmpF ドメイン構造の推定

性器クラミジア D/UW-3/CX 株（遺伝子型 D、登録番号：AY887648）PmpF のドメイン構造を SMART ソフトウェア（http://smart.embl-heidelberg.de/）を用いて推定した[21]。

3-3-5　ドラフトゲノム解析

男性生殖器分離株で HeLa 細胞内で増殖可能であった 12 株の中から、*ompA* 遺伝子型 B で眼疾患タイプの株であった性器クラミジア No.54 を大量培養し、30％Percoll（GE

Healtcare, Little Chalfont, UK）と 145mM NaCl を含む HEPES（Sigma, St. Louis, MO, USA）溶液に懸濁し、4℃で 30000×g、30 分間超遠心（Optima LE-80K：Beckman Coulter, Brea, CA, USA）し、菌体を精製した。精製した菌体のゲノム DNA を High Pure PCR Template Preparation Kit（Roche, Indianapolis, IN）を用いて抽出した。抽出プロトコルはメーカーの指示に従った。ドラフトゲノム情報の取得は Illumiina Miseq sequencer（Illuminia, San Diego, CA, USA）を用い、Pair-end Sequencing 法で行った。細菌の DNA ライブラリーは NEBNext DNA Library Prep master mix set for Illumina（New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA）を用いて準備した。得られたゲノム情報はコンピューター上での配列アセンブラーソフトウェア（Platanus 1.2.1）[22]を用いて構築し、226 から 253,058 bp サイズの 14 本のコンティグ配列を得た[23]。ドラフトゲノム情報は DDBJ へ登録した（BCAM01000001-BCAM01000014）。遺伝子のアノテーションには Rapid Annotation using Subsystem Technology（RAST: http://rast .nmpdr.org/）を使用した[23]。得られた遺伝子情報の機能のアノテーションには Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes（KEGG）（http：//www.genome.jp/keg/）[24]を用いた。*pmpB* 遺伝子配列解析には NCBI（National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA）に登録されている性器クラミジアの *pmpB* 配列を既知の配列情報として使用した。

3-3-6　統計解析

それぞれの群（Japan-males, Ref-males, Japan-females, Ref-females）の平均対比距離値（average pairwise distance values）は系統学的距離の値で決定し、それぞれの群間で比較した。群間でのデータの分散は分散の一元分析と重回帰分析（一元配置分散分析）を用いて行った。群間でのデータ比較はボンフェローニのポストホック多重比較試験（ボンフェローニ法）も用いて評価した。P 値＜0.01 を有意差ありとした。

3-4　結果

3-4-1　男性泌尿生殖器分離株群の PmpF アミノ酸配列の高い配列保存性と同一性

PmpF アミノ酸配列の統計学的再構築により Out-group 以外に 3 つの異なるクラスターが見つかった（図 2）。興味深いことに、Out-group を含めると 4 つのクラスターが形成されたが、Japan-females 群は全てのクラスター（clusters 1－3）に含まれた一方で、Japan-males 群の株は 2 つのクラスター（cluster 1,2）に集積していた。

2 つのクラスターに集積した男性生殖器分離株群が PmpF アミノ酸配列の高い配列保存性と同一性を有するかどうかを調査するために、統計学的距離値を決定し群間で比較した。まず初めに、PmpF アミノ酸配列の全長を比較解析した。しかしながら、結果としては、それぞれの群間で統計学的距離値の有意差は見られなかった（平均± 標準偏差 : Japan-males : 0.147±0.178、Ref-males : 0.192±0.204、 Japan-females : 0.171±0.194、Ref-females : 0.166±0.200（Variance : p＝0.798, 一元配置分散分析; Comparison : 図 3A, ボンフェローニ法）。一方で、全長の PmpF アミノ酸配列の統計学的距離値の全体平均は、配列内の多型を生じた位置が分散しているために、部分的な多型の存在は隠されてしまい、正確に部分的多型が生じて

いるかどうかを表すことができない。V 型分泌装置 PmpF は、外膜に埋め込まれるカルボキシ末端領域の β-バレルドメインと β-バレル構造によって形成されるチャンネルを通過し外膜表面に露出するパッセンジャードメインの 2 つの異なる構造から構成され、外膜を貫通し外膜表面に露出する部位のほうがより宿主の選択圧に晒される可能性が高いと提言されている[14]。従って、PmpF パッセンジャードメインは菌体外環境に暴露し続けることになるため、パッセンジャードメインのアミノ酸配列（およそ 670 アミノ酸残基から成り、男性株と女性株の間で同様の多型性がみられる“ヒンジ部”も含まれる）は、より多様であると考えられ、次のステップとしてドメインに限定してそれぞれの群間で比較した。結果として、Japan-males 群の値は他の群に比べて最も低く、Japan-males 群とその他の群間では系統学的距離値に統計学的有意差が見られた（平均±標準偏差 : Japan-males, 0.0002 ± 0.0005; Ref-males, 0.0219 ± 0.0213; Japan-females, 0.0198 ± 0.0227; Ref-females, 0.0152 ± 0.0211）（Variance: $p=2.286\times10^{-9}$, 一元配置分散分析; Comparison: 図 3B, ボンフェローニ法）。

最後に、MAFFT ソフトウェアを使用して構築した配列アライメントをそれぞれの群間で比較解析し、PmpF 分子の配列同一性と特異的部位保存性の程度を解析した。その結果、全ての群でヒンジ部（パッセンジャードメインと β-バレルドメインの中間に位置する部位）の不均一性のレベルは似通っていることが明らかになった（図 4、5）。その一方で、その他の群とは対照的に、Japan-males 群のヒンジ部を除く 670 から 762 アミノ酸残基から成るパッセンジャードメイン配列は、シグナル配列上に存在する一部の特異的アミノ酸残基を除いて、完全に保存されていた（図 4 : Japan_males の性器クラミジア No.626 のみ 3 番目のアミノ酸配列が K から E に置換）。

このように、本研究に使用した Japan-males 群の PmpF アミノ酸配列は多様性に乏しいという点で非常にユニークであり、この発見は女性生殖器膣粘膜面に比べて男性泌尿生殖器から分離された性器クラミジアが受ける宿主選択圧がより小さいということを反映している可能性を示唆している。

3-4-2　男性泌尿生殖器分離株性器クラミジア No.54 のドラフトゲノム配列解析

男性泌尿生殖器分離株で十分に培養増殖可能であった内の 1 株である性器クラミジア性器クラミジア No.54 は、男性泌尿生殖器から分離された株でありながら、眼疾患株に特有な血清型を持つ株であった。眼も男性生殖器株同様に基本的には無菌な環境であるが、排菌機序である涙と尿をはじめとして生理解剖学的な環境選択圧には違いがあるように思われる。それ故に、感染部位に依存した環境選択圧の変化が性器クラミジアの遺伝子多型を誘導しているかどうかを調査するために、ドラフトゲノム情報を取得し解析した。男性泌尿生殖器分離株性器クラミジア No.54 のドラフトゲノム配列は全長（contig 総長として）1,046,714 bp（G＋C 含有率 46.37%、coverage, 300-fold）であった。ゲノム配列には 976 個の遺伝子読み取り枠が存在し、38 個の tRNA と 2 個のリボソーム RNA が含まれていた。KEGG を用いた性器クラミジア女性生殖器分離株 D/UW-3/CX（NC_000117.1）との比較解析では、男性生殖器分離株は主要な炭素代謝経路と III 型分泌装置に属する遺伝子群を保存していた。興味深いことに、BLAST による対比アライメントでは、性器クラミジア No.54

の *pmpB* 配列が、過去に報告のあった病原性クラミジアのいずれにも特徴づけられていないユニークなものであることが明らかになった（図 6）。より詳細なゲノム解析は、クラミジアの適応進化における性差に関連した選択圧の理解を助ける可能性がある。

3-5　考察

外膜に埋め込まれる PmpF の C 末端 β-バレルドメインははっきりと進化的に保存されており、重要なチャンネルとして機能するこのドメインの機能を支持しているということは過去に報告されている[13, 14]。この β-バレルドメインとは対照的に、PmpF パッセンジャードメインは表面に位置するために進化の間でアミノ酸配列の変異を受けている[13-15]。このように、強い宿主の選択圧に曝されている PmpF パッセンジャードメインの多様性は、より高解像度な系統学的マーカーの候補と考えられている[8-13]。

常在細菌を含む女性膣環境から分離された Japan-females 群株は、以前に見つかった Ref-females 群と一致して、かなり多様性を持っている[12, 13]。それに相当するものとして、微生物叢を有する同性愛男性の直腸から分離された性器クラミジアは、女性株の PmpF 同様に、似たような多様性を有し、我々の仮説を支持している。一方で、これは日本人男性から分離された性器クラミジアの PmpF 解析のための初めての研究であり、これらの発見は女性株と男性直腸株のデータに不一致であり、男性泌尿生殖器から分離された性器クラミジアがとてもユニークな特徴である可能性を示唆している。現時点では、Japan-males 群の PmpF がなぜ安定的で、多様性が少ないのかという理由はわかっていない。しかしながら、常在細菌叢の有無など、性差に起因する選択圧が PmpF 分子を標的としている可能性がある。実際に、過去の報告で、性器クラミジアはその血清型により目に感染する株（A-C 型）と生殖器に感染する株（D-K 型、L1-L3 型）の 2 種類に大別されるが、目に感染する性器クラミジア株とは対照的に、生殖器に感染する株は女性膣環境の常在細菌によって IFN-γ 依存性の排除から回避し持続感染型に移行することが解っており[18, 25]、我々の推察を支持している。加えて、性器クラミジアの細胞培養環境での細胞への適応はかなり遅いことが報告されており[26]、短期間で行う性器クラミジアの準備によるゲノム変異に対する影響はほとんどないと考えられる。それ故に、本論文で使用した男性泌尿生殖器分離株の分離培養中におけるゲノム変異の可能性は小さいと考えられ、サンプル採取の起源となった環境の選択圧を反映している可能性が高い。

性器クラミジアの性感染症はパートナー間で交互に細菌の移動が起こることにより引き起こされると一般的に信じられてきた。その一方で、この研究は限定的なデータによる小規模の研究ではあるが、我々のデータは、常在細菌のいない選択圧の乏しい男性の泌尿生殖器では似たような性器クラミジア株が誕生するが、一方でそれらの株が女性生殖器に移り、常在細菌を有する膣環境などの高選択圧環境に適応するためにより大きな多様性を獲得していくというような可能性を推察させる。加えて、Japan-females 群株に比較して、本研究に使用した Japan-males 群は同じ日本国内でも地理的な分布がより広いという点からも、これらの仮説を支持している（図 1）。これらの可能性を明らかにしていくためにもサンプル数を増やした大規模な解析などのさらなる検討が必要である。

また、男性泌尿生殖器分離株性器クラミジア No.54 は *ompA* 遺伝子型が B 型であり、本来であれば目に感染し結膜炎などを引き起こす血清型である[27]。しかしながら、性器クラミジア No.54 は男性泌尿生殖器から分離された株であり、そのゲノム配列には他の菌株と異なる選択圧を受け変異した形跡が残されている可能性がある。そこで、この性器クラミジア No.54 のドラフトゲノム情報を取得し、本研究では PmpF 以外の Pmps ファミリータンパク質をコードする遺伝子配列についても、過去に報告された性器クラミジアのゲノム情報と比較検討した。その結果、*pmpF* を除く *pmpA-I* の内で、性器クラミジア No.54 の *pmpB* 配列は唯一過去の報告のどの株とも異なるユニークな配列を有していることが明らかになった。それ故に、男性生殖器分離株群の PmpF だけでなく性器クラミジア No.54 の PmpB でも配列多型性の変化が見られたことから、Pmps ファミリータンパク質は菌体外環境の選択圧を反映して変異が生じている可能性がある。また、眼疾患患者から分離された株は生殖器由来培養細胞よりも眼由来培養細胞で発育しやすいことが明らかにされ[28]、加えて、IFN-γ に対する抵抗性も異なるなど、血清型の違いによる組織親和性の違いが生じることが報告されている[29-31]。このことは、男性や女性生殖器または眼と生殖器のように感染局所部位の選択圧により、性器クラミジアの進化を規定するような遺伝子変異が生じているという仮説をさらに支持していると考えられる。しかしながら、男性生殖器分離株 PmpF のデータ同様に、小規模の研究であることから、これらの可能性を明らかにするにはサンプル数を増やしたさらなる検討が必要である。

まとめると、我々の研究は男性と女性それぞれに感染した性器クラミジアに由来する PmpF 配列比較を報告した初めての研究であり、日本における男性分離株の PmpF は多様性が少なくより安定的であるという新規の発見を示したものである。我々の発見は、PmpF パッセンジャードメインは、性器クラミジア株の多様性や進化を簡易的に定義する際に、高解像度の系統学的マーカーとして有用であり、男性生殖器の性器クラミジア株が常在細菌叢を欠くために多様性の乏しい泌尿生殖器に適応した可能性を示唆している。加えて、男性生殖器分離株性器クラミジア No.54（*ompA* 遺伝子型 B 型、眼疾患タイプ）のドラフトゲノム解析から、ユニークな遺伝子変異を見つけ、宿主の選択圧による遺伝子変異の可能性を報告した。将来的に、男性泌尿生殖器から分離された性器クラミジア株の全ゲノム解析を伴う大規模研究は、性器クラミジアの宿主特異的適応に対する新規の発見をもたらし、性器クラミジアの病原性をより理解するうえで重要な役割を果たす可能性がある。

3-6　結論

性器クラミジア男性生殖器分離株の PmpF パッセンジャードメイン配列は、女性生殖器分離株や男性同性愛者直腸分離株と異なり、系統学的有意に配列の多型性が少ない。加えて、眼疾患型性器クラミジアの男性生殖器分離株性器クラミジア No.54 のドラフトゲノム解析を行い、PmpF だけでなく *pmpB* 配列にこれまで報告の無かったユニークな変異が見つかった。

3-7　参考文献

1. Horner P (2006) The case for further treatment studies of uncomplicated genital *Chlamydia*

trachomatis infection. *Sex Transm Infect*. 82:340-343.
2. Paavonen J, Vesterinen E (1982) *Chlamydia trachomatis* in cervicitis and urethritis in women. *Scand J Infect Dis*. 32:45-54.
3. Westergaard L, Philipsen T, Scheibel J (1982) Significance of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in postabortal pelvic inflammatory disease. *Obstet Gynecol*. 60:322-325.
4. Faxelid E, Krantz I (1993) Experiences of disease and treatment among *Chlamydia* patients. *Scand J Caring Sci*. 7:169-173.
5. Gimenes F, Souza RP, Bento JC, Teixeira JJ, Maria-Engler SS, Bonini MG (2014) Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nat Rev Urol*. 12:672-687.
6. Redgrove KA, McLaughlin EA (2014) The role of the immune response in *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract: a double-edged sword. *Front Immunol*. 5:534.
7. Ronald AR, Alfa MJ (1996) Microbiology of the genitourinary system. Medical microbiology. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; [Chapter 97].
8. Harris SR, Clarke IN, Seth-Smith HM, Solomon AW, Cutcliffe LT, Marsh P (2012) Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet*. 44:413-419.
9. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*. 282:754-759
10. Vandahl BB, Birkelund S, Christiansen G (2004) Genome and proteome analysis of *Chlamydia*. *Proteomics*. 4:2831-2842.
11. Nunes A, Gomes JP, Mead S, Florindo C, Correia H, Borrego MJ (2007) Comparative expression profiling of the *Chlamydia trachomatis pmp* gene family for clinical and reference strains. *PLoS One*. 2:e878.
12. Tan C, Hsia RC, Shou H, Haggerty CL, Ness RB, Gaydos CA (2009) *Chlamydia trachomatis*-infected patients display variable antibody profiles against the nine-member polymorphic membrane protein family. *Infect Immun*. 77:3218-3226.
13. Gomes JP, Nunes A, Bruno WJ, Borrego MJ, Florindo C, Dean D (2006) Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism. *J Bacteriol*. 188:275-286.
14. Henderson IR, Lam AC (2001) Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp.--autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends Microbiol*. 9:573-578.
15. Wang SP, Kuo CC, Barnes RC, Stephens RS, Grayston JT (1985) Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. *J Infect Dis*. 152:791-800.
16. Gomes JP, Bruno WJ, Nunes A, Santos N, Florindo C, Borrego MJ (2007) Evolution of *Chlamydia trachomatis* diversity occurs by widespread interstrain recombination involving hotspots. *Genome Res*. 17:50-60.
17. Yamazaki T, Matsuo J, Nakamura S, Oguri S, Yamaguchi H (2014) Effect of *Ureaplasma parvum* co-incubation on *Chlamydia trachomatis* maturation in human epithelial HeLa cells

treated with interferon-γ. *J Infect Chemother*. 20:460-464.
18. Jeffrey BM, Suchland RJ, Quinn KL, Davidson JR, Stamm WE, Rockey DD (2010) Genome sequencing of recent clinical *Chlamydia trachomatis* strains identifies loci associated with tissue tropism and regions of apparent recombination. *Infect Immun*. 78:2544-2553.
19. Yamazaki T, Matsumoto M, Matsuo J, Abe K, Minami K, Yamaguchi H (2012) Frequency of *Chlamydia trachomatis* in *Ureaplasma*-positive healthy women attending their first prenatal visit in a community hospital in Sapporo, Japan. *BMC Infect Dis*. 12:82.
20. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Res. 30:3059-3066.
21. Letunic I, Copley RR, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P (2006) SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res*. 34(Database issue):D257-260.
22. Kajitani R, Toshimoto K, Noguchi H, Toyoda A, Ogura Y, Okuno M, abana M, Harada M, Nagayasu E, Maruyama H, Kohara Y, Fujiyama , Hayashi T, Itoh T (2014) Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res*. 24:1384-1395.
23. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O (2008) The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 9:75.
24. Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M (1999) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 27:29-34.
25. Caldwell HD, Wood H, Crane D, Bailey R, Jones RB, Mabey D (2003) Polymorphisms in *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. *J Clin Invest*. 111:1757-1169.
26. Borges V, Ferreira R, Nunes A, Sousa-Uva M, Abreu M, Borrego MJ (2013) Effect of long-term laboratory propagation on *Chlamydia trachomatis* genome dynamics. *Infect Genet Evol*. 17:23-32.
27. Abdelsamed H1, Peters J, Byrne GI (2013) Genetic variation in *Chlamydia trachomatis* and their hosts: impact on disease severity and tissue tropism. *Future Microbiol*. 8:1129-1146
28. Miyairi I, Mahdi OS, Ouellette SP, Belland RJ, Byrne GI (2006) Different Growth Rates of *Chlamydia trachomatis* Biovars Reflect athotype. *J Infect Dis*. 194:350–357
29. Morrison RP (2000) Differential sensitivities of *Chlamydia trachomatis* strains to inhibitory effects of gamma interferon. *Infect Immun*. 68:6038-6040.
30. Fehlner-Gardiner C1, Roshick C, Carlson JH, Hughes S, Belland RJ, Caldwell HD, McClarty G (2002) Molecular basis defining human *Chlamydia trachomatis* tissue tropism. A possible role for tryptophan synthase. *J Biol Chem*. 277:26893-26903.
31. Caldwell HD, Wood H, Crane D, Bailey R, Jones RB, Mabey D, Maclean I, Mohammed Z, Peeling R, Roshick C, Schachter J, Solomon AW, Stamm WE, Suchland RJ, Taylor L, West SK,

Quinn TC, Belland RJ, McClarty G (2003) Polymorphisms in *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. *J Clin Invest*. 111:1757–1769.

第 3 章図表

表 1　性器クラミジアの起源と *pmpF* 配列の登録番号

Category	Strain name	Origen (Sex)	Isolated from	*ompA* genotype (accession number)	*pmpF* accession number	Notes	References *
Japan-malse	404	Male	Urethra	I (LC031847)	LC031825	This study **	
(*n* =12)	414	Male	Urethra	I (LC031848)	LC031826	This study	
	419	Male	Urethra	D (LC031849)	LC031827	This study	
	440	Male	Urethra	I (LC031850)	LC031828	This study	
	441	Male	Urethra	I (LC031851)	LC031829	This study	
	519	Male	Urethra	G (LC031852)	LC031830	This study	
	520	Male	Urethra	D (LC031853)	LC031831	This study	
	54	Male	Urethra	B (LC031846)	LC031823	This study	
	626	Male	Urethra	K (LC031854)	LC031832	This study	
	627	Male	Urethra	J (LC031855)	LC031833	This study	
	664	Male	Urethra	F (LC031856)	LC031834	This study	
	687	Male	Urethra	J (LC031857)	LC031824	This study	
Reference-malse	11023	Male	rectum	E (See reference)	ADH21375.1	Other study ****	[18]
(*n* =7)	150	Male	rectum	E (See reference)	ADH17683.1	Other study	[18]
	9301	Male	rectum	G (See reference)	ADH97547.1	Other study	[18]
	9768	Male	rectum	G (See reference)	ADH18603.1	Other study	[18]
	11222	Male	rectum	G (See reference)	ADH19530.1	Other study	[18]
	11074	Male	rectum	G (See reference)	ADH20449.1	Other study	[18]
	6276	Male	rectum	J (See reference)	AGS02743.1	Other study	[18]
						***	
Japan-females	nv266	Female	cervix	G (AB695149)	LC031835	This study (isolated previously)	[17]
(*n* =11)	nv283	Female	cervix	B (AB695151)	LC031836	This study (isolated previously)	[17]
	nv287	Female	cervix	F (AB695152)	LC031837	This study (isolated previously)	[17]
	nv307	Female	cervix	I (AB695154)	LC031838	This study (isolated previously)	[17]
	nv381	Female	cervix	K (AB695161)	LC031839	This study (isolated previously)	[17]
	nv399	Female	cervix	E (AB695162)	LC031840	This study (isolated previously)	[17]
	nv417	Female	cervix	J (AB695165)	LC031841	This study (isolated previously)	[17]
	nv437	Female	cervix	G (AB695170)	LC031842	This study (isolated previously)	[17]
	nv441	Female	cervix	I (AB695171)	LC031843	This study (isolated previously)	[17]
	nv443	Female	cervix	D (AB695172)	LC031844	This study (isolated previously)	[17]
	nv448	Female	cervix	D (AB695173)	LC031845	This study (isolated previously)	[17]
Reference-females	CS-431/04	Female	Urogenital	Da (See reference)	DQ065748.1	Other study ****	[16]
(*n* =12)	I-174	Female	Urogenital	E (See reference)	DQ065747.1	Other study	[16]
	I-149	Female	Urogenital	G (See reference)	DQ065746.1	Other study	[16]
	I-24	Female	Urogenital	I (See reference)	DQ065744.1	Other study	[16]
	CS-190/96	Female	Urogenital	Ia (See reference)	DQ065743.1	Other study	[16]
	I-139	Female	Urogenital	H (See reference)	DQ065742.1	Other study	[16]
	CS-121/96	Female	Urogenital	H (See reference)	DQ065741.1	Other study	[16]
	CS-490/95	Female	Urogenital	G (See reference)	DQ065740.1	Other study	[16]
	S-91	Female	Urogenital	Ja (See reference)	DQ065739.1	Other study	[16]
	537C-05	Female	Urogenital	E (See reference)	EF490369.1	Other study	[11]
	S-141	Female	Urogenital	E (See reference)	EF490368.1	Other study	[11]
	CS-500-96	Female	Urogenital	E (See reference)	EF490367.1	Other study	[11]

*本研究に使用した性器クラミジアの群（Category）、株名（Strain name）、分離起源となった組織（Isolate from）、*ompA* 遺伝子型と *ompA* 遺伝子配列の登録番号［*ompA* genotype（accession number）］、*pmpF* 遺伝子配列の登録番号、本研究室の報告かどうか（Notes）、参考文献（Reference）を表記した。

**Notes の This study は本研究室での報告を示している。

***This study（isolated previously）は本研究室からの以前の報告で使用された株であることを示している（参考文献 17）。

****Other study は参考文献 11, 16, 18 の報告にあった性器クラミジア株を使用した。

図 1

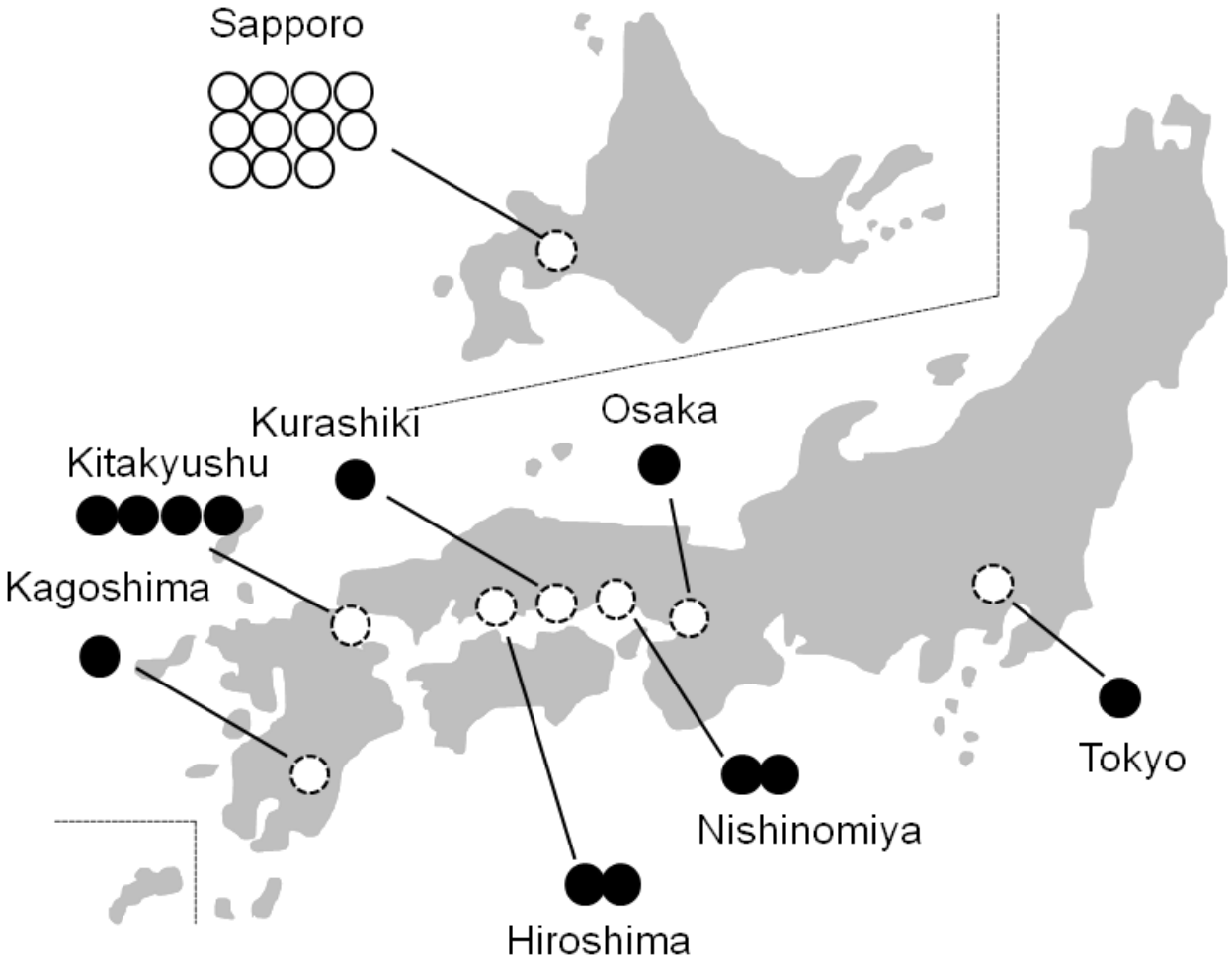


図 1　日本の性器クラミジア男性泌尿生殖器株（●）と女性生殖器株（○）の採取地図
　日本の性器クラミジアの採取地情報。破線で描かれた丸（◌ ）は採取地の位置を表しており、黒丸と白丸の数はそれぞれのサンプル数を表している。

表 2　*ompA* 遺伝子と *pmpF* 遺伝子の増幅のためのプライマー

Gene	Primer	Sequence	Gene location	size (bp)	Reference
For *ompA* genotyping					
	P1	5'-ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG-3'	1–22 (For full length amplification and seuqencing)	1,124	[18]
	OMP2	5'-ACTGTAACTGCGTATTTGTCTG-3'	1,124–1,103 (For full length amplification and sequencing)		[18]
For *pmpF* sequencing					
	PmpF-2	5'-CTTATCTTCAGCGCATTCGTCCTTC-3'	(−)91–(−)67 (For full length amplification and sequencing)	3,664	[13]
	PmpF-1	5'-GAATGGCTCCGCCTTCTCTTATTTT-3'	(+)468–(+)444 (For full length amplification and sequencing)		[13]
	F-7	5'-GCATTCGTCCTTCTCTCTTT-3'	(−)80–(−)60 (For sequencing)		[13]
	F-4	5'-TGACAGGGAATCGAACTCT-3'	513–543 (For sequencing)		[13]
	F-6	5'-AAATTATATCCATACAGGGA-3'	1,092–1,112 (For sequencing)		[13]
	F-8	5'-TTCACTAGTTTTTTTCTGCT-3'	2,041–2,021 (For sequencing)		[13]
	F-5	5'-GAGTGAAATTTCCCTTTAGA-3'	2,630–2,610 (For sequencing)		[13]
	F-3	5'-ATTCTAGAAGGAACCTCTCT-3'	(+)76–(+)56 (For sequencing)		[13]

図 2

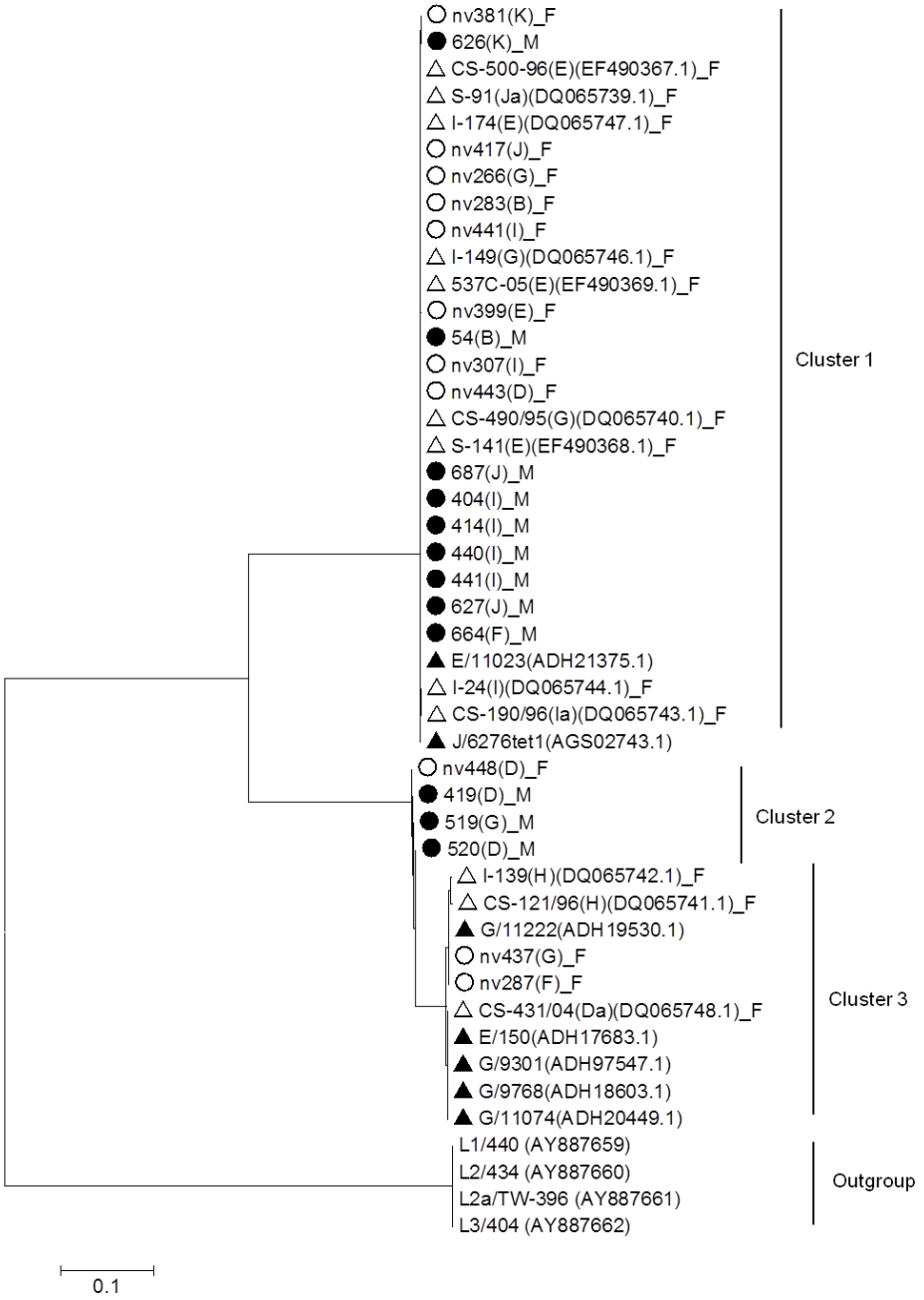
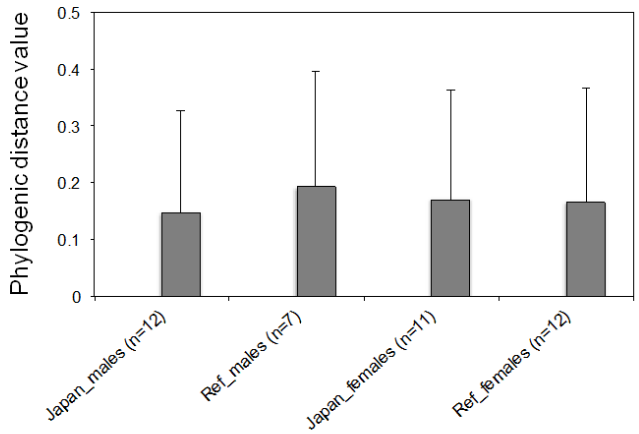


図 2　PmpF アミノ酸配列の系統樹

この系統樹は近隣結合法(NJ 法)を用いて MAFFT ソフトウェアによって作成された[20]。24 個の異なる細菌株の PmpF 配列を使用した[Japan-males（male：M）n=12、Ref-males n=7、Japan-females（female：F）n=11、 Ref-females n = 11]。Japan-males（●）、Ref-males（▲）、Japan-females（○）、Ref-females（△）。株名には *ompA* 遺伝子型を記した。参考文献から得た株（Ref-males と Ref-females）には登録番号を示した。

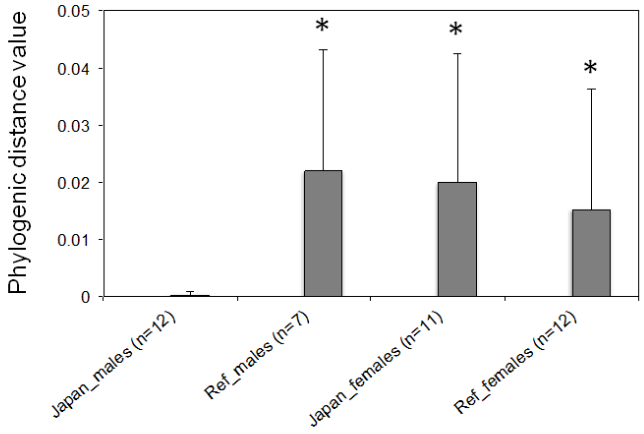
図 3

A



	Japan_males	Ref_males	Japan_females	Ref_females
Japan_males (n=12)		1	1	1
Ref_males (n=7)			1	1
Japan_females (n=11)				1
Ref_females (n=12)				

B



	Japan_males	Ref_males	Japan_females	Ref_females
Japn_males (n=12)		0 *	0 *	0 *
Ref_males (n=7)			0.904	1
Japn_females (n=11)				1
Ref_females (n=12)				

図 3　PmpF のアミノ酸配列の系統学的距離値の比較

PmpF アミノ酸配列の系統学的距離値の比較を（A）全長、（B）670 アミノ酸のパッセンジャードメインでそれぞれ行った。それぞれのカテゴリーごとの対飛距離値の平均値は系統学的距離値から決定し、カテゴリーごとに比較した。表の値はボンフェローニ法による統計解析値を表している。系統発生解析と統計解析は $p < 0.01$（＊）を有意差ありとした。

図 4

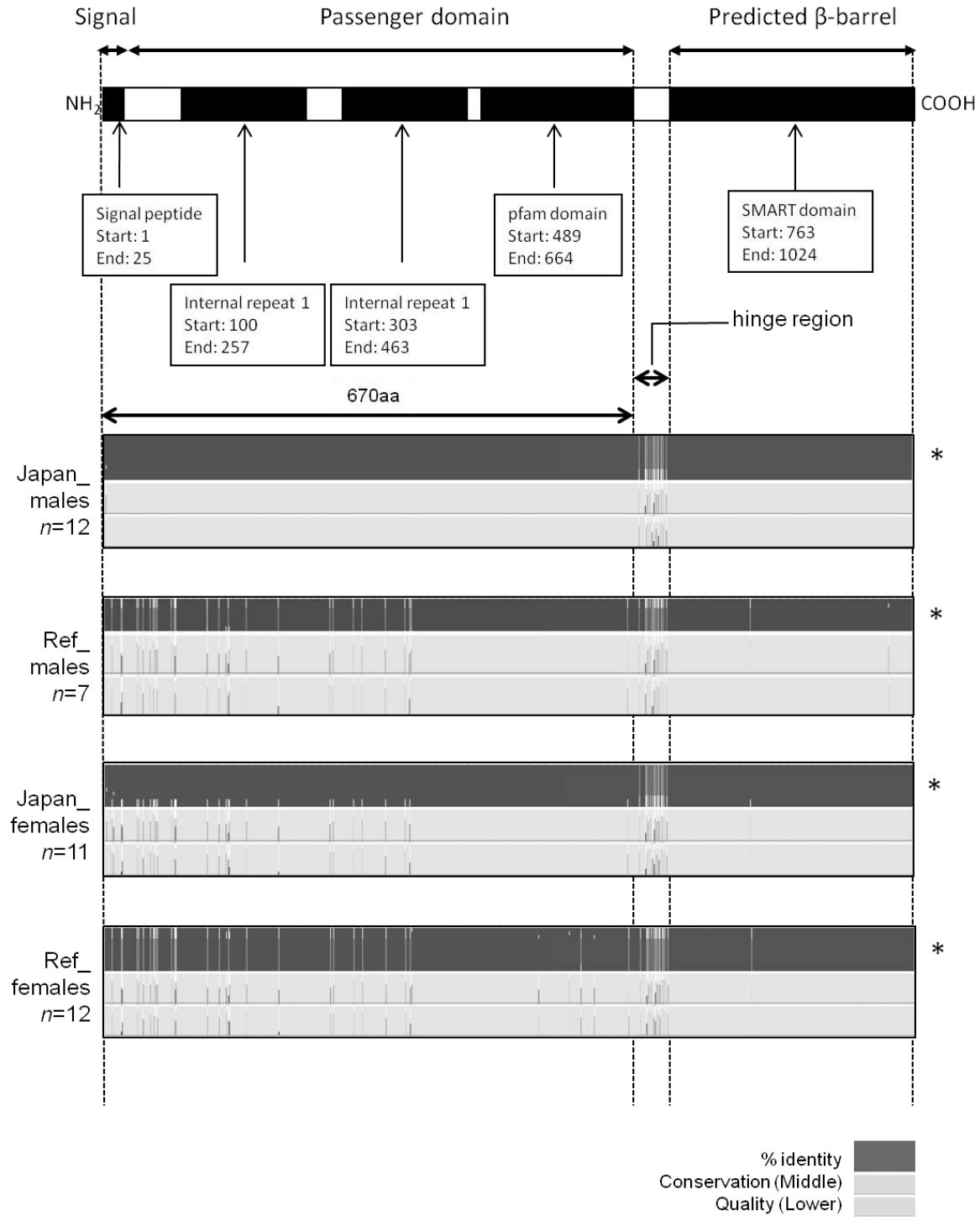


図 4　PmpF アミノ酸配列の配列同一性の分析と配列保存性の評価

配列同一性と配列保存性の解析のためのアライメント構築は MAFFT ソフトウェアを用いて行った[20]。性器クラミジア D/UW-3/CX（血清型 D）PmpF のドメイン構造は SMART ソフトウェア（http://smart.emblheidelberg.de/）を用いて推定した[22]（最上段模式図）。配列枠内（＊）の白く抜けている垂直線は低い同一性（%）を示し、保存性が乏しいことを示している。

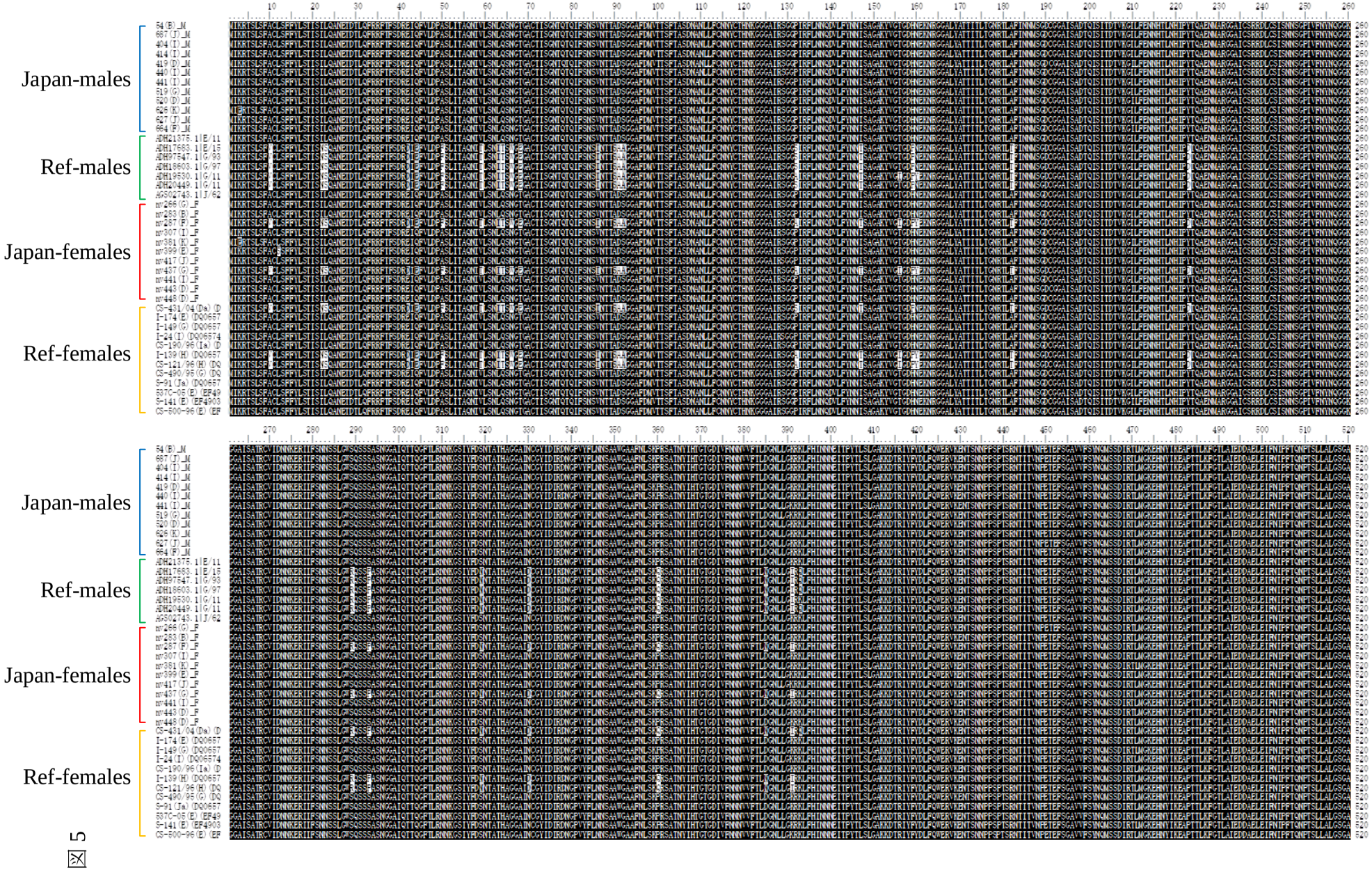

Japan-males
Ref-males
Japan-females
Ref-females
Japan-males
Ref-males
Japan-females
Ref-females

図 5

図 5（続き）

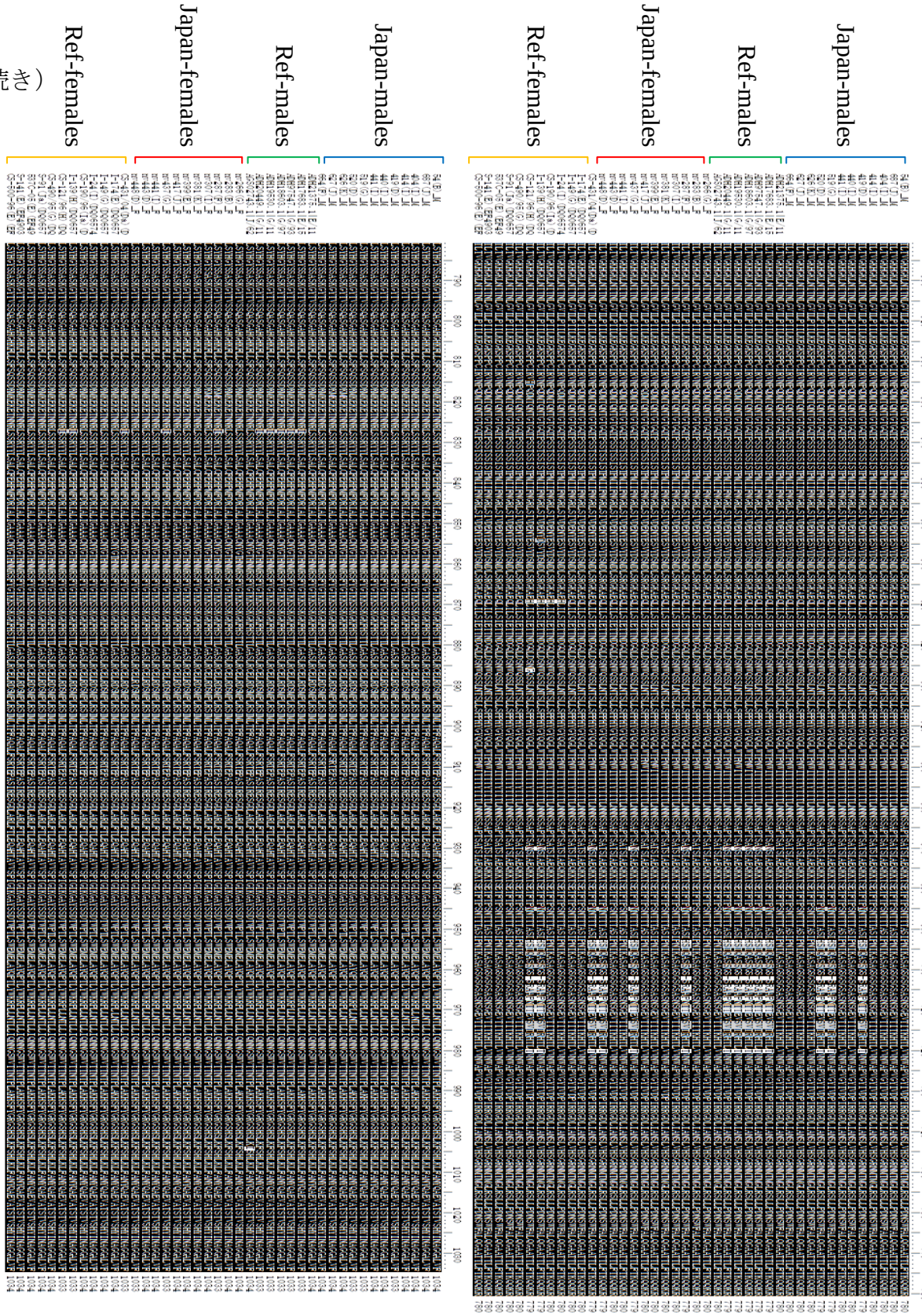


図 5　PmpF アミノ酸配列解析の高解像度イメージ

配列同一性と配列保存性の解析のためのアライメント構築を MAFFT ソフトウェアを用いて行った際の高解像度イメージ画像を示した。白く抜けたように見える部分は配列保存性の乏しいアミノ酸残基。

図 6

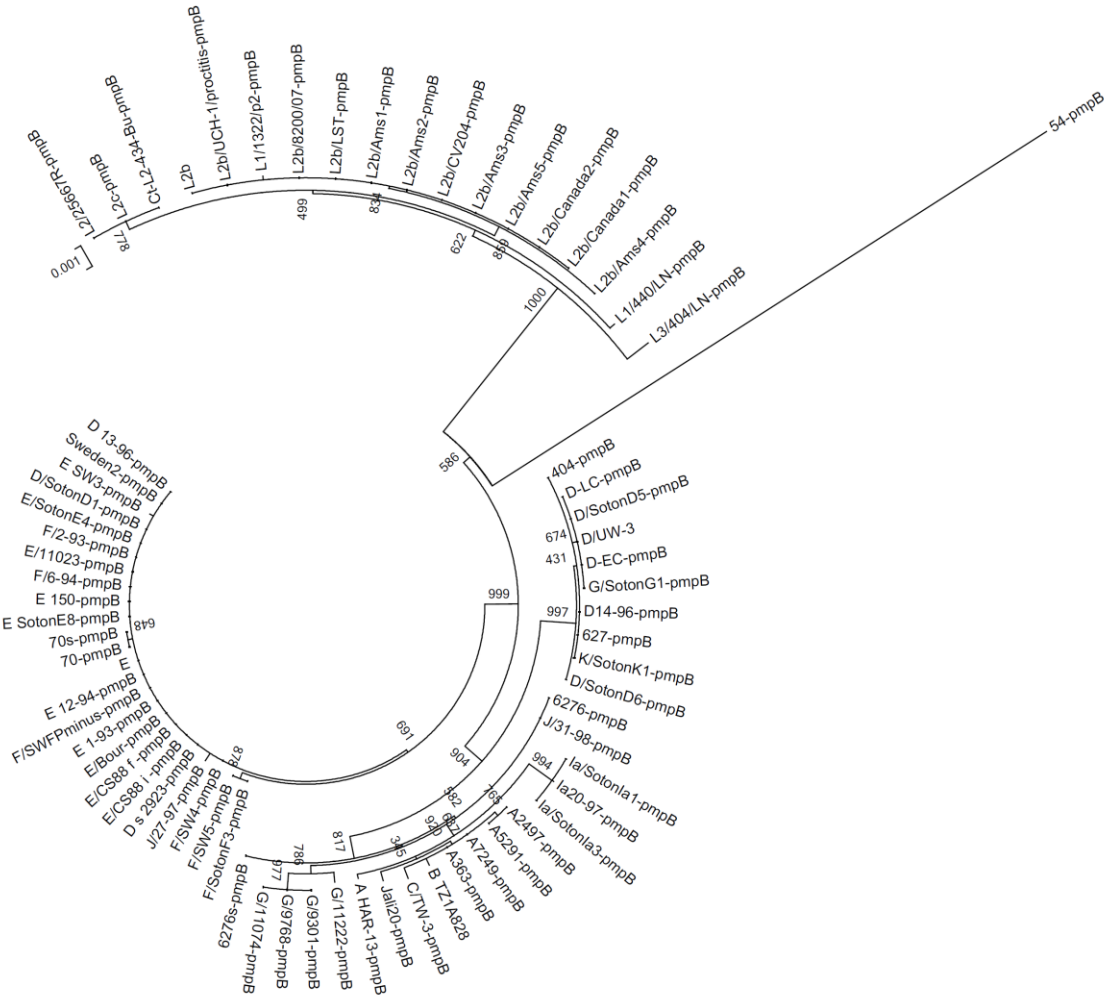


図 6　*pmpB* の系統解析

pmpB 遺伝子配列の系統解析を行った。*pmpB* 遺伝子配列を基に近隣結合法を用いて作製した性器クラミジア株の *pmpB* 遺伝子配列系統樹。性器クラミジア男性泌尿生殖器分離株で血清型 B（トラコーマ型）である性器クラミジア No.54 がユニークな配列を有していることを示した。

第 4 章

病原性クラミジアの新規エフェクター候補遺伝子の探索と緑色蛍光タンパク質発現性器クラミジアの作製

（論文未掲載）

4-1　第 4 章概要

偏性細胞内寄生性細菌であり、ヒトに病気を引き起こす病原性クラミジア（性器クラミジアや肺炎クラミジア）は、感染宿主細胞環境を操作するために、III 型分泌装置によって宿主細胞に打ち込まれる様々なエフェクターを巧みに利用している。例えば、Tarp（translocated actin-recruiting phosphoprotein）は宿主細胞のアクチン重合をコントロールし、宿主細胞へ侵入する際に利用される。しかしながら、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、クラミジアの宿主細胞環境操作の仕組みには未知の部分が多い。そこで、本研究では、クラミジアの遺伝子発現をカスタマイズ DNA マイクロアレイ［標的遺伝子数： 843（性器クラミジア)、945（肺炎クラミジア)］で解析した後に、3 つのアルゴリズムが異なるフリーソフトウェア（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をコンピューター上で推定した。本研究では、クラミジアの再感染に重要なエフェクター候補遺伝子を見つけ出すために、増殖環の後期に発現が顕著に上昇する遺伝子（初期と比べて 2.5 倍以上）に焦点を当てた（感染時に備え増殖後期に菌体内に蓄積するので)。その結果、エフェクター候補遺伝子は性器クラミジアで 18、肺炎クラミジアで 12 遺伝子が推定された。それら遺伝子の多くは未同定の仮想タンパク質としてアノテーションされたが、Tarp の様な既にエフェクターとして知られている一部の遺伝子もまた検出された。最終的に、エフェクター候補遺伝子が、クラミジアが宿主細胞に感染した後期に発現が上昇していることを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によって確認した。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り、遺伝子操作を用いた研究が立ち遅れているが、遺伝子組み換え株を容易に作製することが可能であれば、標識したエフェクタータンパク質の感染細胞内での動態を簡易的に調査でき、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。そこで、本研究では過去に報告のあった、一般的に汎用されている大腸菌プラスミドに性器クラミジアの潜在的プラスミドをその *ori* を含め挿入することで、大腸菌とクラミジア間のシャトルベクターを構築し、緑色蛍光タンパク質（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 融合タンパク質の遺伝子導入株の作製には至っていないが、GFP 融合タンパク質としてエフェクタータンパク質をクラミジア菌体内で発現することができれば、クラミジア感染細胞内でのエフェクタータンパク質の局在を簡易的に観察できる可能性がある。

4-2　緒言

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、感染宿主細胞と密接に相互作用することで増殖する。特に、感染宿主細胞環境を操作し、自身の発育や増殖に適した環境を作り出すために、III 型分泌装置によって宿主細胞に打ち込まれる様々なエフェクターを巧みに利用している[1-3]。第 1 章でも述べたとおり、クラミジアの III 型分泌装置エフェクターとして知られるタンパク質はいくつかその存在が確認されている。よく研究が進んでいるものとして、Tarp（translocated actin-recruiting phosphoprotein）は宿主細胞のアクチンリン酸化を操作してアクチン重合をコントロールし、細胞骨格をリモデリングすること

で、クラミジアが宿主細胞へ侵入する際に使用されることが分かっている[4]。また、IncA（inclusion membrane protein A）は III 型分泌装置から菌体外に分泌された後、封入体膜に局在し、封入体同士の融合に関与している[5, 6]。また、CopN（chlamydial outer protein N）は、tublin に結合し、宿主の細胞分裂を阻害していると考えられているが、性器クラミジアと肺炎クラミジアではその働きが違うのではないかという報告もある[7, 8]。このように III 型分泌装置エフェクターと推定されていても、機能や標的分子が明らかになっていないタンパク質もいくつか存在している[9]。一方で、クラミジアが自身の発育に有利な様に宿主細胞環境を最適化するうえで、現在明らかになっているエフェクタータンパク質の数はあまりにも少ない。特に感染初期に利用されると考えられているエフェクタータンパク質は Tarp 以外にほとんど見つかっていない。また、Tarp のように感染初期に利用されると考えられるエフェクタータンパク質は増殖環の後期に遺伝子発現が上昇すると考えられている。そこで、本研究では既知のクラミジアゲノム情報を基に、コンピューター上で III 型分泌装置エフェクター推定ソフトウェアを用いて、クラミジアの感染初期に利用される新規エフェクター候補遺伝子の推定を行い、ゲノムアノテーションから、その機能を予測した。

一方、クラミジア自身に遺伝子導入を行いタンパク質の強制発現系が構築できれば、これらエフェクター候補遺伝子の簡易的な機能評価に利用できる可能性が高い。しかしながら、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、菌の培養に細胞培養を必要とすることで培養日数やコストがかかること、寒天培地上での発育ができないために抗菌剤選択後の単一コロニーの取得が困難であること、プラスミドやファージなどの記述が未だ確立されていないために商業的なシステムの購入や改変が容易でないことなどの理由から、遺伝子操作技術が他の菌に比べて立ち遅れてきているため、遺伝子導入は非常に困難である。その中でも、世界中でいくつかのグループがクラミジアの遺伝子操作技術の開発に挑戦してきた。標的遺伝子を限定せずに遺伝子変異体を作製するために、遺伝子変異源であるエチルメチルスルホン酸（EMS）を用いたランダムな遺伝子変異によるクラミジア表現形変化を報告した研究もあるが、任意の遺伝子を変異させることは困難である[10]。初期のクラミジアへの遺伝子導入法は電気穿孔法（エレクトロポレーション）によって行われたが、エレクトロポレーションによる性器クラミジアへの遺伝子導入は安定的ではなく、理由は定かではないが、維持することができなかった[11]。続いて、エレクトロポレーションによるオウム病クラミジアへの遺伝子導入法が報告されたが、相同組換えによる対立遺伝子交換法であったため、導入位置の配列と導入する遺伝子配列が限定されてしまい、導入部位と導入遺伝子が可能な部位が限定されているため、応用的かつ簡易的に利用するには非現実的な方法であった[12]。このように、クラミジアの染色体上の遺伝子改編法が模索される一方で、クラミジアが持つプラスミドの研究も並行して進んできた。クラミジア種の多くは広く保存された約 7.5 kbp の潜在的プラスミドを有し[13-16]、8 つのタンパク質翻訳領域（ORF）を持ち、染色体遺伝子の *glgA* の発現をコントロールしてグリコーゲンの産生に関わっていることが知られている[17-20]。しかしながら、性器クラミジアのプラスミド欠損株が見つかっており、グリコーゲンの産生能は失われるが、生存に不可欠なわけではないことが明らかとなり、プラスミドを人為的に改変することが可能であることが

示唆された[20-24]。これらの研究を踏まえ 2011 年に Wang らによって、潜在的プラスミド欠損性器クラミジア株に、潜在的プラスミドを改変し $CaCl_2$ を用いて挿入することで遺伝子導入する比較的簡便な方法が報告された[25]。以降、この潜在的プラスミドを用いた方法を応用した遺伝子導入法が数件報告されており[26-28]、ナノ粒子であるデンドリマーを遺伝子を細胞内へ輸送するツールとして調整し、$CaCl_2$ を使用せず、細胞や菌体に大きな障害を与えることなく、プラスミドを細胞内のクラミジア菌体に輸送し取り込ませるという方法も開発された[27]。現在では、潜在的プラスミドを持っている株でもプラスミドの不和合（プラスミドの増殖に必要な複製、分配機能が類似しており、競合することなどが原因となり、2 種類のプラスミドが同一個体内に共存できない状態）と抗菌薬選択により遺伝子導入可能であることが示されている[28]。そこで、本研究ではエフェクター候補遺伝子を絞り込み、それらの遺伝子導入性器クラミジア株を作製するための足掛かりとして、GFP 発現性器クラミジアを Wang らの方法を参考に構築することに成功した。

4-3　対象と方法

4-3-1　細菌と細胞

ヒト上皮系細胞株 HEp-2 細胞（肺炎クラミジアの培養に使用）と HeLa 細胞（性器クラミジアの培養に使用）は、それぞれ American type culture collection（ATCC； Manassas, VA, USA）と Riken cell bank（Tsukuba, Japan）より購入した。各培養細胞は、Dullbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM； Sigma, St. Louis, MO, USA）に 10%非働化済ウシ胎児血清（FCS）と 3 種類の抗菌薬［GVA： gentamicin（10 μg/mL）, vancomycin（10 μg/mL）, amphotericin B（0.5 μg/mL）（全て Sigma より購入 ）］を加えた培地を用い、5%CO_2、 37℃条件下で培養した。性器クラミジア *Chlamydia trachomatis* L2 434/Bu 株は ATCC より購入し、肺炎クラミジア *Chlamydia pneumoniae* TW183 株は G. Byrne（University of Wisconsin, Madison, WI, USA）より供与され、それぞれを HEp-2 細胞に感染増殖させ準備した。具体的な方法は第 2 章：対象と方法、2-3-2　性器クラミジアの準備に記した方法で行った。

4-3-2　DNA マイクロアレイ

性器クラミジア L2 434/Bu 株（NC_010287.1）と肺炎クラミジア TW183 株（NC_005043.1）のゲノムアノテーション情報は NCBI（National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, Bethesda, MD, USA）より取得し、全てのタンパク質翻訳領域（ORF）の遺伝子発現量を測定できるようなカスタマイズ DNA マイクロアレイを構築した。クラミジア増殖環の初期と後期の遺伝子発現を調査するために、それぞれのクラミジアを MOI 3-10 で上皮細胞に感染させ（遠心：800×g、30 分）、37℃、5％CO_2 条件下で培養し、性器クラミジアは感染 12 時間後と 36 時間後、肺炎クラミジアは感染 12 時間後と 72 時間後にサンプルを回収した。回収したサンプルから High Pure RNA Isolation Kit（Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA）を用いて RNA を抽出し、それぞれのサンプルのクラミジア遺伝子の発現量をカスタマイズ DNA マイクロアレイ（北海道システムサイエンス、札幌）で測定した。

4-3-3　III 型分泌装置エフェクタータンパク質の推定

DNA マイクロアレイの結果を基に絞り込んだ性器クラミジアと肺炎クラミジアの遺伝子配列をそれぞれ、異なるアルゴリズムを有する 3 つのエフェクター推定ソフトウェア、Effectors4.0（http://www.effectors.org/）[29]、Modlab（http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/T3SS_prediction/T3SS_prediction.html）[30]、PredictProtein（https://www.predictprotein.org/）[31]を用いてエフェクタータンパク質かどうかを予測した。3 つのソフトウェアの内、2 つ以上のソフトウェアによってエフェクターと予測された遺伝子をエフェクター候補遺伝子とした。Effectors4.0 と Modlab は“positive”、PredictProtein の結果については“Secreted”（菌体外に分泌されると予想されるタンパク質）となったものを陽性と判定した。

4-3-4　逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）

4-3-2　DNA マイクロアレイのサンプル回収条件と同様に、サンプルを回収し、RNA を抽出した。RNA は DNase により DNA を除去した後、NanoDrop 1000（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）で RNA 量を測定した。DNA 除去後の RNA 1 μg を逆転写反応によって cDNA を合成し、Taq polymerase を用いた PCR で感染初期と後期の遺伝子発現量を推定した。PCR のための性器クラミジアと肺炎クラミジアの各遺伝子に対するプライマーは Primer3 software（http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/）[32]によって構築し、ASONE（Osaka）に委託し、作成した。

4-3-5　プラスミドシャトルベクターの作製

性器クラミジア L2 434/Bu から FastGene Plasmid Mini Kit（日本ジェネティクス、東京）を用いて、潜在的プラスミド pL2（約 7.5 kbp）を抽出した（図 1：pL2）。大腸菌の複製開始点 ori を含み、β-ラクターマーゼ産生領域（ペニシリン耐性領域）を有する pUC19 プラスミドは New England Biolabs（NEB；Ipswich, MA, USA）より購入した（図 1：pUC19）。EGFP を含むプラスミド pEGFP-C1 プラスミドは琉球大学医学部保健学研究科病原体検査学平井到教授より供与された（図 1：pEGFP-C1）。pL2 と pUC19 はそれぞれプライマーpL2-F と pL2-R、pUC19-F と pUC19-R を用いて Phusion High-Fidelity DNA Polymerase（NEB）で増幅した。PCR 増幅産物 pL2-F-pL2R と pUC19-F-pUC19-R はそれぞれ制限酵素 SalI、NotI（NEB）で処理し、アガロースゲル電気泳動でサイズを確認後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（日本ジェネティクス）を用いてゲルから精製した。それぞれのゲル精製産物は 2×Instant Sticky-end Ligase Master Mix（NEB）でライゲーションし、大腸菌 *E. coli* Top10 に $CaCl_2$ を用いた化学的遺伝子導入法で導入した後、遺伝子導入した大腸菌を LB 培地（ampicillin 100 μg/ml）で培養した。培養増幅した大腸菌のプラスミド導入株から FastGene Plasmid Mini Kit（日本ジェネティクス）を用いてプラスミドを抽出した（図 1：pL2-UC19）。pEGFP-C1 プラスミドの EGFP 領域とマルチクローニングサイトを、プライマーpEGFP-F と pEGFP-R を用いて、Phusion High-Fidelity DNA Polymerase（NEB）で増幅した。pL2-UC19 プラスミドと PCR 増幅産物 pEGFP-F-pEGFP-R をそれぞれ制限酵素 NotI、SbfI（NEB）で処理し、同様の方法で大腸菌 *E. coli* Top10 に導入し、プラスミドを抽出した。さらに、性器クラミジ

ア菌体内で EGFP を発現するために、性器クラミジア L2-434/Bu 株の IncD プロモーター領域を pIncD_prom-F と pIncD_prom-R で増幅し、pL2-UC19-EGFP と PCR 増幅産物 pIncD_prom-F-pIncD_prom-R を制限酵素 SbfI、SpeI（NEB）で処理した後、同様の方法でプラスミド抽出し、形質転換用プラスミドとした（図 1：pL2-UC19-IncD_prom-EGFP、*配列情報は別冊に記した）。構築したプラスミドは Macrogen（Seoul, Korea）に依頼し配列を確認した。シャトルベクター作製と配列確認に利用したプライマーは表 1 にまとめた。

4-3-6　性器クラミジアへの遺伝子導入

性器クラミジアのプラスミド遺伝子導入法は Wang らの方法を一部改変して使用した[25]。性器クラミジア L2-434/Bu 株を $CaCl_2$ Buffer（10 mM Tris, 50mM $CaCl_2$ pH7.4）で処理し、pL2-UC19-IncD_prom-EGFP-C1 プラスミドを 0.6 μg 加え、室温で 30 分間インキュベートした後、HeLa 細胞に遠心（800×g、30 分）し感染させた。遠心後、培養液を新たな 10%FCS 添加 DMEM（GVA）に置き換え、37℃、5%CO_2 で 40-48 時間培養した。培養後、細胞をセルリフターで掻き取って回収し、26G×1/2”注射針（0.45×13mm；テルモ、東京）に 5 回通し、細胞を完全に破壊した後、1500rpm、5 分遠心し、細胞成分を沈めた。菌体を含む上清を新たな HeLa 細胞に再感染（遠心：800×g、30 分）させ、培養上清を 10%FCS 添加 DMEM（GVA、penicillin G 0.1 U/ml）に置き換えて、37℃、5%CO_2 で 40-48 時間培養した。そして、再び菌体を分離して感染させ、培養上清を 10%FCS 添加 DMEM（GVA、penicillin G 1 U/ml）に置き換えて、37℃、5%CO_2 で 40-48 時間培養し、penicillin G の濃度を上げて選択した。培養後、この再感染と回収のサイクルを、培養液 10%FCS 添加 DMEM（GVA、penicillin G 1 U/ml）で、6−8 回繰り返し遺伝子導入株を得た。遺伝子導入の成否は、penicillin G 1 U/ml 存在下での封入体表現形の顕微鏡観察と封入体内部の GFP 緑色蛍光の有無で判断した。加えて、プラスミドの導入と GFP の発現は PCR とウエスタンブロットでも確認した。PCR に用いたプライマーは表 1 に記述した。ウエスタンブロッティングの方法は第 2 章の対象と方法に記載した方法に準拠した。使用した抗体は 1 次抗体にはマウス抗 GFP モノクローナル IgG2b 抗体（Medical ＆ Biological Laboratories, Nagoya, Japan）を、2 次抗体にはセイヨウワサビーペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG+M（H+L）抗体（Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA）を使用した。標識蛋白は Pierce® Western Blotting Substrate（Thermo, Rockford, IL）で可視化した。

4-4　結果

4-4-1　クラミジア III 型分泌装置新規エフェクター候補遺伝子の探索

クラミジアは独自の増殖環によって宿主細胞内で増殖するが、その増殖サイクルのタイミングによって発現するタンパク質の種類や量が異なっている[1-3]。そこでまず初めに、性器クラミジアと肺炎クラミジアの全ての遺伝子発現レベルを調べるために、性器クラミジア 842 遺伝子と肺炎クラミジア 945 遺伝子のカスタマイズ DNA マイクロアレイを構築し、スクリーニングを行った。感染の初期である宿主細胞への侵入や RB の分化までに EB が使用するタンパク質は、EB が細胞から放出される前までの感染後期に遺伝子発現量が高

くなることが分かっている[3, 4]。本研究では感染初期の EB が使用する新規エフェクターに焦点を絞り、感染後期に感染初期よりも発現量が 2.5 倍以上に上昇した遺伝子を候補①とした。候補①の数は性器クラミジアで 106 遺伝子、肺炎クラミジアで 117 遺伝子だった。

次に、3 つの III 型分泌装置エフェクター推定ソフトウェアを用いて、コンピューター上で遺伝子配列からエフェクターかどうかを推定した。3 つのソフトウェア（Effectors 4.0、Modlab、PredictProtein）は全て公開されているツールであり、誰でも使用することができ、異なるアルゴリズムを持っており[29-31]、本研究では 2/3 のソフトウェア上でコード領域が分泌タンパク質と推定された遺伝子を候補②とした（表 2）。候補②の数は性器クラミジアで 18 遺伝子、肺炎クラミジアで 12 遺伝子に絞られた。これら候補遺伝子の多くが未同定の仮想タンパク質のコード領域として同定されたが、一方で、よく知られているエフェクタータンパク質であり、感染初期に使用される Tarp も候補遺伝子のなかに含まれていたため、コンピューター上での推定という方法論の妥当性を支持している。

最後に、候補②の遺伝子が DNA マイクロアレイの結果に合致し、増殖環の後期で顕著に発現が上昇しているかを、RT-PCR を用いて調査した。その結果、性器クラミジアで 10 遺伝子、肺炎クラミジアで 7 遺伝子が感染初期よりも感染後期で明らかに発現上昇していることが分かり候補③とした（図 2）。これら候補③として選択した遺伝子の中には、性器クラミジアの Tarp や肺炎クラミジアの CopB という既によく知られているクラミジアエフェクタータンパク質も予想通り含まれていた。これにより、最終的に、性器クラミジア 8 遺伝子、肺炎クラミジア 7 遺伝子を新規エフェクター候補遺伝子とした。

4-4-2　GFP 発現性器クラミジアの作製

クラミジアの遺伝子操作技術は、偏性細胞内寄生性という特異な性質のために困難である。しかしながら、Wang らのグループによって報告された、プラスミドシャトルベクターを用いたクラミジアの遺伝子導入法が 2011 年に報告され、クラミジアへの遺伝子導入が可能であることが示された[25]。そこで、我々は、新規エフェクター候補遺伝子の感染細胞内での動態を簡易的に捉える方法を開発するために、Wang らの方法を参考にして、性器クラミジアの遺伝子導入株の作製を試みた。エフェクター候補遺伝子の細胞内での局在をみるために、EGFP（enhanced-GFP：高感度緑色蛍光タンパク質）融合タンパク質となるよう導入し、クラミジア内で発現させれば、クラミジア感染細胞内での局在を簡便に見ることができる。そこで、まず EGFP 発現プラスミドシャトルベクターを性器クラミジアの潜在的プラスミドを用いて構築し、配列に問題がないことを確認した（別冊の色分けシャトルベクター配列情報を参照）。性器クラミジアへ導入して、感染細胞内での動態を蛍光顕微鏡下で観察した。図 3 は非固定の HeLa 細胞内での EGFP の発現を示したものである。また、シャトルベクターの導入は株化した導入株でプラスミドを抽出し、シャトルベクター固有の領域を有しているかで確認した（図 4A）。EGFP 発現はウエスタンブロッティングを用いてタンパク質レベル（図 4B）で確認できた。このように自身で構築したプラスミドシャトルベクターを用いたクラミジアへの遺伝子導入が可能であることがわかったので、現在は性器クラミジア III 型分泌装置新規エフェクター候補遺伝子の EGFP 融合タンパク質の遺

伝子導入を目指し、実験を進めている。

4-5　考察

クラミジアは宿主細胞に感染し、宿主細胞内でのみ増殖できる、偏性細胞内寄生性という特異な増殖環を持ち、EB と RB の 2 つの形態に分化して増殖するユニークな性質を持っている[33]。そのため、クラミジアは宿主細胞と密接に相互作用しており、栄養の獲得や細胞内環境の快適化などを行っている[34, 35]。宿主細胞との相互作用において、中心的かつ重要な役割を果たしているのがエフェクタータンパク質と呼ばれる、クラミジア菌体内から菌体外へ分泌されるタンパク質である。これらエフェクタータンパク質はクラミジアの細胞壁に存在するいくつかの種類の分泌装置によって菌体細胞外へと分泌されるが、その中でも III 型分泌装置は針状構造をしており、宿主細胞膜を貫通してエフェクタータンパク質を細胞質に直接打ち込む仕組みを持っている[1-3]。クラミジアは III 型分泌装置を菌体膜表面に複数持ち、EB と RB の 2 つの形態の両方で確認されている[1]。また、増殖環の初期と後期で使用されるエフェクターの種類や量は異なっている[1-3]。例えば、Tarp は感染初期の宿主細胞への感染、侵入の際にアクチンの重合をコントロールして細胞への菌体の取り込みを促進する働きをしており、RB から EB へと再分化する感染後期には遺伝子の発現量が高まっていることが分かっている[3, 4]。また、III 型分泌装置を構成する構造タンパク質はエルシニアやサルモネラなどのタンパク質との比較解析やタンパク質合成による構造解析などが進んでいる[35, 36]。しかしながら、エフェクタータンパク質として同定されているタンパク質はそれほど多くない。そこで、本研究では、カスタマイズ DNA マイクロアレイの遺伝子発現量のデータと遺伝子配列のコンピューターソフトウェア解析によって、クラミジア増殖環の早期に使用するエフェクターの新規候補遺伝子を見つけ出した。DNA マイクロアレイは多数の遺伝子発現を網羅的に解析するスクリーニングとして有用ではあるが、サンプルを採取した一点の限局した発現量の値であり、遺伝子の発現パターンが不規則であったり、発現量が極端に少なかったりする場合やプローブのハイブリダイゼーションが不正確な場合などでは正確な発現量比を調べることは困難である。それ故に、個々の遺伝子が DNA マイクロアレイの結果に一致して発現しているかは確認が必要である。そこで、DNA マイクロアレイのデータの確認のために RT-PCR を行い、最終的に、新規エフェクター候補遺伝子として、性器クラミジアで 8 遺伝子、肺炎クラミジアで 7 遺伝子を見つけた。これら候補遺伝子がコードするタンパク質はほとんどが機能未知の仮想タンパクであり、性器クラミジアと肺炎クラミジアの候補間で相同性は見られなかった。また今回、Tarp 以外に候補遺伝子として絞り込まれた既知の III 型分泌装置エフェクタータンパク質（CTL0841、CpB0838、CpB0840）は、これまでに分泌の時期が示されてこなかったが、感染初期に分泌され、利用されている可能性がある。また、他に III 型分泌装置エフェクタータンパク質としてよく知られている IncA などは、分泌される時期が感染初期ではない、あるいは感染初期に限定されないために候補に残らなかったと考えられる。クラミジアは約 1 Mbp の染色体上に 900 程度のタンパク質読み取り枠を有しているが、そのうちの約 200 個の遺伝子はアノテーションがつかない仮想タンパク質である[17]。本研究で見つ

けた新規エフェクター候補遺伝子を含め、クラミジアの機能未知タンパク質の役割の解明によって、クラミジアの細胞修飾機構や病態形成機構が詳細に理解できると考えられる。それ故に、クラミジア感染細胞内でエフェクターの動態など、クラミジアの標的タンパク質の機能を感染細胞内で確認する方法は十分になく、機能未知タンパク質の解析に必要となっている。

現在まで、クラミジアエフェクターの感染細胞内での局在同定には、標的タンパク質合成から動物への免疫による特異的抗体の産生が必須であった[37]。しかしながら、抗体産生には様々な障害があり、タンパク質合成から単離、動物への免疫などを一研究室単位で全て行うとかなりの時間が必要である。また、抗体産生の委託事業なども今日ではよく行われているが、かなりの費用がかかるものがほとんどである。加えて、作製された抗体が本当に特異的に反応するかどうかの確認が必要となり、別のタンパクと交差反応してしまうリスクもある。特に、クラミジアは偏性細胞内寄生性のために、宿主のタンパク質との交差反応を生じてしまった場合には使用が困難になってしまう。このような理由からか、クラミジアのエフェクター候補タンパク質が分泌装置を通過するのかどうかを調べる際には、エルシニアなどの別のグラム陰性細菌の分泌装置を利用する方法が報告されている[5, 35, 36]。また、タンパク質の局在判定に標識タンパク質を細胞に発現させて局在を見る方法なども行われているが[38]、実際にクラミジアが分泌したタンパク質でも同様の局在を示すのかは疑問が残る。以上のことから、クラミジアタンパク質の感染細胞内での局在を、簡便かつ正確に捉える方法が求められている。

一方、2011 年に Wang らによって、プラスミドシャトルベクターを用いたクラミジア遺伝子導入法が報告され、クラミジアの遺伝子導入が比較的簡便に行える可能性ができた[25]。また、クラミジアの遺伝子導入法に標識タンパク質を加えることで、本研究で得られたエフェクター候補遺伝子のように機能未知タンパク質の細胞内局在や会合分子の同定につながり、機能解析の有力な手法となると考えられる。そこで本研究では、まず初めの足掛かりとなる実験として、プラスミドシャトルベクターを構築し、Wang らの方法に従って EGFP 発現性器クラミジアを作製した。また、蛍光標識タンパク質融合エフェクタータンパク質は III 型分泌装置を容易に通過するため[26]、この方法を応用し、EGFP 融合タンパク質を導入すれば、クラミジア感染細胞内でのタンパク質の局在が生細胞のまま追跡でき、EGFP をタグとして分離することでタンパク質との宿主細胞内会合分子の同定にも役立つと考えられる。現時点では、GFP 融合新規エフェクター候補遺伝子のクラミジアへの遺伝子導入までには至っていないが、エフェクター候補遺伝子タンパク質の GFP 融合タンパク質発現導入クラミジアを構築し、エフェクターの局在を簡易的に調べる方法として確立したい。クラミジア感染細胞内での今後クラミジア研究を革新的に進めていける技術であり、病態形成機構のさらなる解明から性器クラミジア感染症や肺炎クラミジアによる呼吸器感染症の根本的治療などに貢献できると考えている。

4-6　結論

病原性クラミジアのゲノム配列からカスタマイズ DNA マイクロアレイを構築し、DNA

マイクロアレイとコンピューター上でのフリーソフトウェアを用いた III 型分泌装置エフェクター候補遺伝子の推定により、新規エフェクター候補遺伝子として、性器クラミジアで 8 遺伝子、肺炎クラミジアで 7 遺伝子を発見した。また、これら新規エフェクター候補遺伝子の細胞内動態研究の足掛かりとして、性器クラミジアの EGFP 発現遺伝子導入株を作製した。

4-7　参考文献

1. Peters J, Wilson DP, Myers G, Timms P, Bavoil PM (2007) Type III secretion à la *Chlamydia*. *Trends Microbiol*. 15:241-251.
2. Betts-Hampikian HJ, Fields KA (2010) The Chlamydial Type III Secretion Mechanism: Revealing Cracks in a Tough Nut. *Front Microbiol*. 19;1:114.
3. Ferrell JC, Fields KA (2015) A working model for the type III secretion mechanism in *Chlamydia*. *Microbes Infect*. pii: S1286-4579(15)00229-4.
4. Clifton DR, Fields KA, Grieshaber SS, Dooley CA, Fischer ER, Mead DJ, Carabeo RA, Hackstadt T (2004) A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:10166-10171.
5. Subtil A, Parsot C, Dautry-Varsat A (2001) Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. Mol Microbiol. 39:792-800.
6. Delevoye C, Nilges M, Dehoux P, Paumet F, Perrinet S, Dautry-Varsat A (2008) SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoS Pathog*. 4:e1000022.
7. Subtil A. Archuleta TL, Du Y, English CA, Lory S, Lesser C, Ohi MD, Ohi R, Spiller BW (2011) The *Chlamydia* effector chlamydial outer protein N (CopN) sequesters tubulin and prevents microtubule assembly. *J Biol Chem*. 286:33992-33998.
8. Ishida K, Matsuo J, Yamamoto Y, Yamaguchi H (2014) *Chlamydia pneumoniae* effector chlamydial outer protein N sequesters fructose bisphosphate aldolase A, providing a benefit to bacterial growth. *BMC Microbiol*. 14:330.
9. Hobolt-Pedersen AS, Christiansen G, Timmerman E, Gevaert K, Birkelund S (2009) Identification of *Chlamydia trachomatis* CT621, a protein delivered through the type III secretion system to the host cell cytoplasm and nucleus. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 57:46-58.
10. Kari L, Goheen MM, Randall LB, Taylor LD, Carlson JH, Whitmire WM, Virok D, Rajaram K, Endresz V, McClarty G, Nelson DE, Caldwell HD (2011) Generation of targeted *Chlamydia trachomatis* null mutants. Proc Natl Acad Sci U S A. 108:7189-7193.
11. J.E. Tam, C.H. Davis, P.B. Wyrick (1994) Expression of recombinant DNA introduced into *Chlamydia trachomatis* by electroporation. *Can J Microbiol*. 40:5835–5891.
12. Binet R, Maurelli AT (2009) Transformation and isolation of allelic exchange mutants of *C. psittaci* using recombinant DNA introduced by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:292-297.

13. Palmer L, Falkow S. (1986) A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. Plasmid. 16:52-62.
14. Sriprakash KS, Macavoy ES (1987) Characterization and sequence of a plasmid from the trachoma biovar of *C. trachomatis*. *Plasmid*. 18:205-214.
15. Thomas NS, Jusher M, Storey CC, Clarke IN (1997) Plasmid diversity in *Chlamydia*. *Microbiology*. 143:1847-1854.
16. Farencena A, Comanducci M, Donati M, Ratti G, Cevenini R (1997) Characterization of a new isolate of *Chlamydia trachomatis* which lacks the common plasmid and has properties of biovar trachoma. *Infect Immun*. 65:2965-2969.
17. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*. 282:754-759
18. Iliffe-Lee ER, McClarty G (2000) Regulation of carbon metabolism in *Chlamydia trachomatis*. *Mol Microbiol*. 38:20-30.
19. O'Connell CM, AbdelRahman YM, Green E, Darville HK, Saira K, Smith B (2011) Toll-like receptor activation by *Chlamydia trachomatis* is plasmid-dependent and plasmid-responsive chromosomal loci are coordinately regulated in response to glucose limitation by *C. trachomatis* but not by *C. muridarum*. *Infect Immun*. 79:1044-1056.
20. Carlson JH, Whitmire WM, Crane DD, Wicke L, Virtaneva K, Sturdevant DE (2008) The *Chlamydia trachomatis* plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor. *Infect Immun*. 76:2273-2283.
21. Peterson EM, Markoff BA, Schachter J, de la Maza LM (1990) The 7.5 kbp plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism. Plasmid. 23:144-145.
22. O'Connell CM, Nicks KM (2006) A plasmid-cured *Chlamydia muridarum* strain displays altered plaque morphology and reduced infectivity in cell culture. *Microbiology*. 152:1601-1607.
23. Russell M, Darville T, Chandra-Kintal K, Smith B, Andrews CW, O'Connell CM (2011) Infectivity acts as in vivo selection for maintenance of the chlamydial cryptic plasmid. *Infect Immun*. 79:98-107.
24. Rockey DD (2011) Unraveling the basic biology and clinical significance of the chlamydial plasmid. *J Exp Med*. 208:2159-2162.
25. Wang Y, Kahane S, Cutcliffe LT, Skilton RJ, Lambden PR, Clarke IN (2011) Development of a transformation system for *Chlamydia trachomatis*: restoration of glycogen biosynthesis by acquisition of a plasmid shuttle vector. *PLoS Pathog.* 7:e1002258.
26. Bauler LD1, Hackstadt T (2014) Expression and targeting of secreted proteins from *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol*. 196:1325-1334.
27. Kannan RM, Gérard HC, Mishra MK, Mao G, Wang S, Hali M, Whittum-Hudson JA, Hudson AP (2013) Dendrimer-enabled transformation of *Chlamydia trachomatis*. *Microb Pathog*. 65:29-35.
28. Wang Y, Kahane S, Cutcliffe LT, Skilton RJ, Lambden PR, Persson K, Bjartling C, Clarke IN

(2013) Genetic transformation of a clinical (genital tract), plasmid-free isolate of *Chlamydia trachomatis*: engineering the plasmid as a cloning vector. *PLoS One*. 8:e59195.

29. Arnold R, Brandmaier S, Kleine F, Tischler P, Heinz E, Behrens S, Niinikoski A, Mewes HW, Horn M, Rattei T (2009) Sequence-based prediction of type III secreted proteins. *PLoS Pathog*. 5:e1000376.
30. Löwer M, Schneider G (2009) Prediction of type III secretion signals in genomes of gram-negative bacteria. *PLoS One*. 4:e5917.
31. Yachdav G, Kloppmann E, Kajan L, Hecht M, Goldberg T, Hamp T, Hönigschmid P, Schafferhans A, Roos M, Bernhofer M, Richter L, Ashkenazy H, Punta M, Schlessinger A, Bromberg Y, Schneider R, Vriend G, Sander C, Ben-Tal N, Rost B (2014) PredictProtein--an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Res*. 42(Web Server issue):W337-343.
32. Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 132:365-386.
33. 熊本悦明、橋爪壮 編著（1988）クラミジア感染症の基礎と臨床. 金原出版株式会社
34. 阿部章夫（2008）「病原最近の分泌装置：その機能と病原性発揮のメカニズム」感染症学雑誌、83:94-100.
35. da Cunha M, Milho C, Almeida F, Pais SV, Borges V, Maurício R, Borrego MJ, Gomes JP, Mota LJ (2014) Identification of type III secretion substrates of *Chlamydia trachomatis* using *Yersinia enterocolitica* as a heterologous system. *BMC Microbiol*. 14:40.
36. Ho TD, Starnbach MN (2005) The *Salmonella enterica* serovar typhimurium-encoded type III secretion systems can translocate *Chlamydia trachomatis* proteins into the cytosol of host cells. *Infect Immun*. 73:905-911.
37. Lugert R, Kuhns M, Polch T, Gross U (2004) Expression and localization of type III secretion-related proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *Med Microbiol Immunol*. 193:163-171.
38. Bullock HD, Hower S, Fields KA (2012) Domain analyses reveal that *Chlamydia trachomatis* CT694 protein belongs to the membrane-localized family of type III effector proteins. *J Biol Chem*. 287:28078-28086.

第 4 章図表

図 1

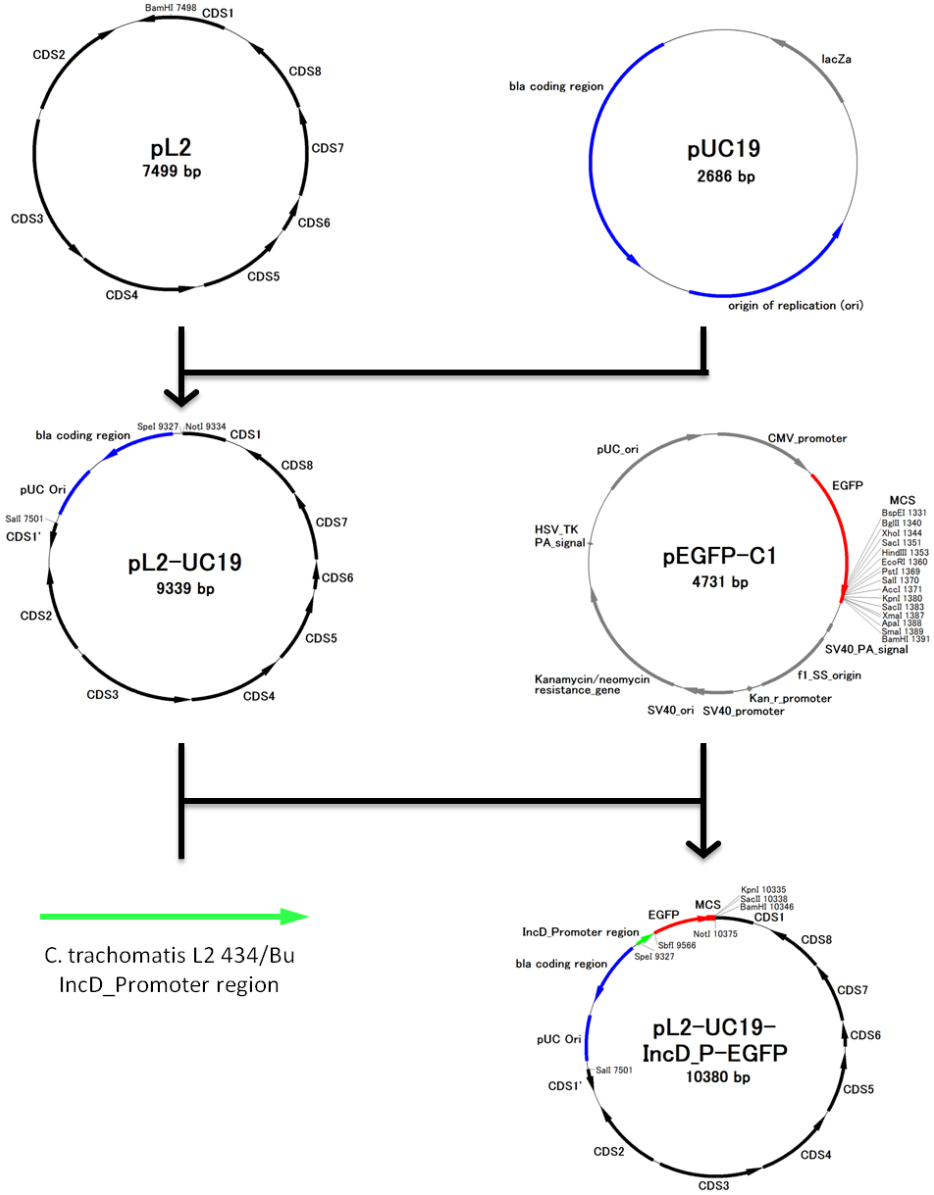


図 1　プラスミドシャトルベクターの構築

性器クラミジアに EGFP 発現を導入するためのプラスミドシャトルベクター構築の流れを示した。まず、性器クラミジアの潜在的プラスミド（pL2）と大腸菌プラスミド（pUC19）の複製開始点（ori）と β ラクタマーゼ産生領域（bla coding region）を融合し、性器クラミジアと大腸菌で増幅可能なシャトルベクター（pL2-UC19）を作製した。pL2-UC19 に EGFP 産生導入プラスミド（pEGFP-C1）の EGFP 領域とマルチクローニングサイト（MCS）を加え、さらに性器クラミジア遺伝子のプロモーター領域（IncD_Promoter region）を EGFP の手前に付与して、性器クラミジアに EGFP 発現を誘導するためのプラスミドシャトルベクター（pL2-UC19-IncD_Promoter-EGFP）を作製した。プラスミドシャトルベクターの作製に使用したプライマーと作製したプラスミドの配列確認に使用したプライマーは表 1 に記載した。

表 1　プラスミドシャトルベクターの作製と配列確認に使用したプライマーリスト

Template (target region)	**Primer name**	**Primer sequence (5' → 3')**
pL2	pL2-F	ATGGTACCGCGGCCGCTCCCTTGTACAATCAATTTACC
	pL2-R	GCGTCGACTCCGTAAGTTAGACGAAATTTTG
pUC19 (E. coli ori, bla coding region)	pUC19-F	ATGTCGACTACGGTTATCCACAGAATCAG
	pUC19-R	GCGCGGCCGCACTAGTAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTA
pEGFP-C1 (EGFP, MCS)	pEGFP-F	ATACTAGTCCTGCAGGATGGTGAGCAAGGGCGAG
	pEGFP-R	GCGCGGCCGCTGATCAGTTATCTAGATCCGG
C. trachomatis L2 434/Bu strain (IncD_Promoter region)	IncD_Prom-F	ATACTAGTAACGGAGCCTTCTAGCTATTTTG
	IncD_Prom-R	GCCCTGCAGGAAACCTCACTTCGACAGAT
Sequence only use*	pL2_seq_2	GTAGAAGATTTTCGTTATAGGAG
	pL2_seq_3	AATATTTGCTATTTCATGCGTTAA
	pL2_seq_4	ATCAACTCCAACGTTAGAGTAA
	pL2_seq_5	TCCTATTTCAGTTCCTCCTAAT-
	pL2_seq_6	AAATATATGCAAGACTTTTAACGT
	pL2_seq_7	CCAGGTCTTCTTCCAAACTTC
	pL2_seq_8	TAGCTGCTATAATCACGAAATTA
	pL2_seq_9	ATAGGTTATATCACGAGGGATT
	pL2_seq_10	GGTTTTGTCTTCGTAACTCG
	pUC19_seq_2	CTCACGTTAAGGGATTTTGGT
	pUC19_seq_3	CGCGCCACATAGCAGAACT

*プラスミドシャトルベクターの配列確認にのみ使用したプライマー。

表 2　病原性クラミジア新規エフェクター候補遺伝子のエフェクター推定ソフトウェア解析結果

A

Ct_L2 434/Bu	Microarray Ratio	Effector prediction			Protein function prediction
locus-tag	36h/12h	E	M	P	BLASTp Description
CTL0671	26.47	+	-	+	polymorphic outer membrane protein pmpC
CTL0398	25.39	-	+	+	hypothetical protein
CTL0040	17.76	-	+	+	hypothetical protein
CTL0399	15.43	+	-	+	hypothetical protein
CTL0238a	10.22	+	-	+	hypothetical protein
CTL0651	9.60	+	+	-	HSP-70 cofactor grpE
CTL0886	8.86	+	+	-	hypothetical protein
CTL0619	7.91	+	+	+	integral membrane protein
CTL0701	7.84	+	+	-	hypothetical protein (cysteine-rich membrane protein crpA)
CTL0035	7.78	-	+	+	hypothetical protein
CTL0233	6.28	-	+	+	protease cpa
CTL0716	5.48	+	+	+	translocated actin-recruiting phosphoprotein tarp
CTL0305	5.33	+	+	+	hypothetical protein
CTL0476	3.91	-	+	+	hypothetical protein (incA family protein)
No hit (peg.876)	3.51	-	+	+	No significant similarity found
CTL0025	3.03	-	+	+	hypothetical protein
CTL0081	3.03	-	+	+	hypothetical protein
CTL0841	2.81	+	+	+	type III secretion system membrane protein copB

B

Cpn TW183	Microarray Ratio	Effector prediction			Protein function prediction
locus-tags	72h/12h	E	M	P	BALSTp annotation top
CpB0704	12.11	+	+	+	hypothetical protein
CpB0491	8.14	-	+	+	hypothetical protein
CpB0825	7.93	+	+	-	autotransporter
CpB0837	5.52	+	+	-	hypothetical protein
CpB0363	4.75	+	+	-	hypothetical protein
CpB0838	4.30	+	+	-	type III secretion system membrane protein
CpB0180	4.21	-	+	+	hypothetical protein
CpB0011	4.04	+	+	-	HB2 protein, partial
CpB0840	3.59	+	+	-	type III secretion low calcium response chaperone LcrH/SycD
CpB0502	3.18	+	-	+	ABC transporter substrate-binding protein
CpB0065	2.86	+	+	-	hypothetical protein
CpB0341	2.53	-	+	+	hypothetical protein

*性器クラミジア 842 遺伝子と肺炎クラミジア 945 遺伝子をそれぞれ 3 つのソフトウェア（E；Effectors、M；Modlab、P；PredictProtein）で解析し、2/3 以上のソフトウェアで陽性となった遺伝子の情報を記載した。（A）性器クラミジア、（B）肺炎クラミジア。遺伝子名（locus-tag）は使用したクラミジア（性器クラミジア L2 434/Bu、肺炎クラミジア TW183）の遺伝子名ナンバリングをそれぞれ記載した。また、カスタマイズ DNA マイクロアレイでの発現量の比（Microarray ratio；感染後期発現量／感染初期発現量）を示した。+（色付き）；陽性、-；陰性。また、それぞれの遺伝子がコードするタンパク質配列を BLASTp で解析し、最も高率にアノテーションされたタンパク質機能を表に示した。

図 2

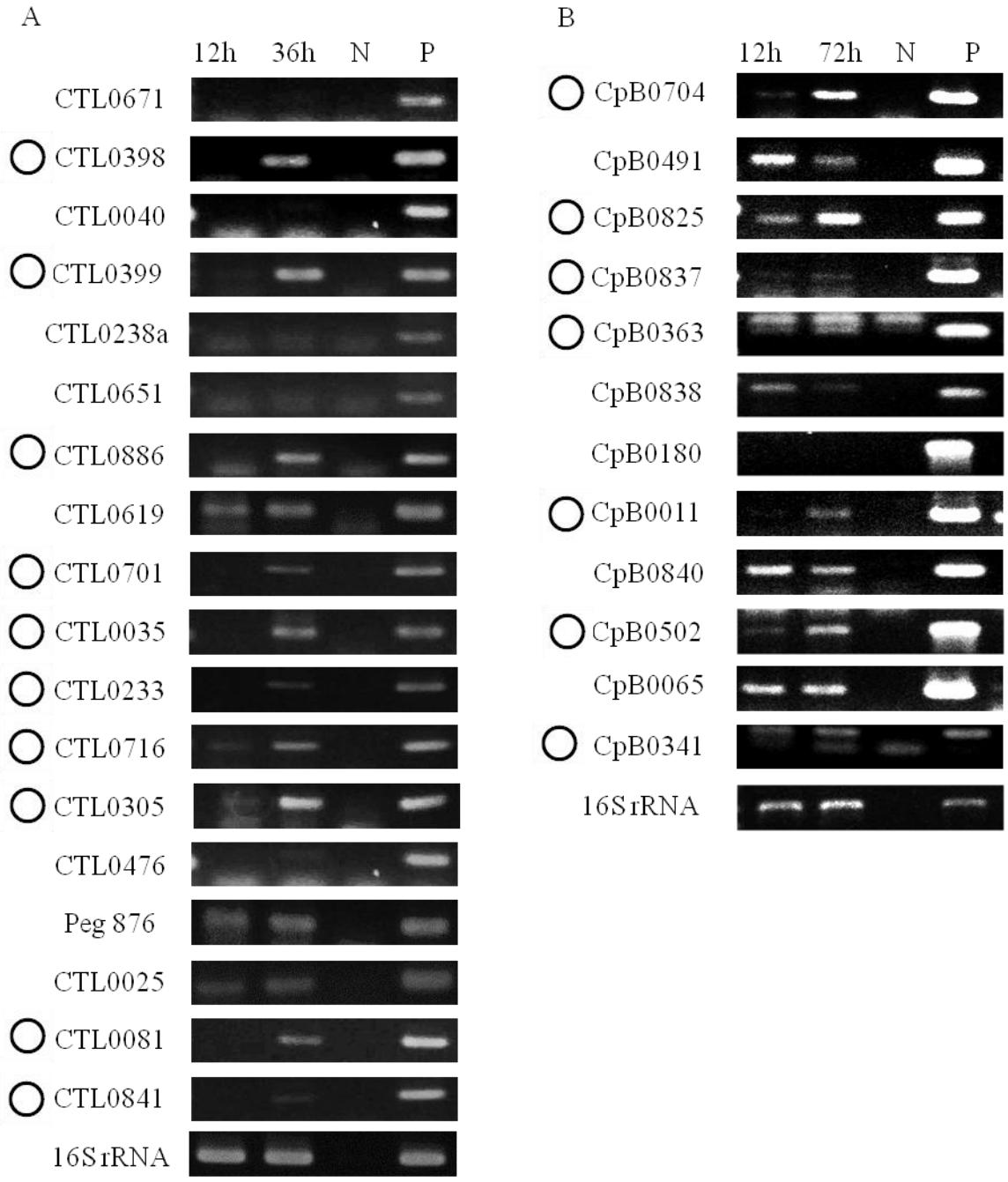


図 2　病原性クラミジア新規エフェクター候補遺伝子の RT-PCR

性器クラミジア L2 434/Bu 株（A）、肺炎クラミジア TW183 株（B）をそれぞれ HeLa 細胞と HEp-2 細胞に MOI 3-10 で感染させ、感染初期と感染後期でそれぞれ回収し、RNA を抽出後、1μg 相当量を逆転写酵素により反応させ、cDNA を得た。各々の遺伝子に対するプライマーを用いて PCR し、アガロースゲル電気泳動で特異的なバンドを確認した。感染初期よりも感染後期において明らかな発現上昇がみられたものには locus-tag 名の横に丸（○）を記した。それぞれのコードするタンパク質のアノテーション情報は表 2 に記載した。*16S rRNA* 遺伝子はクラミジアの内部標準遺伝子として示した。

図 3

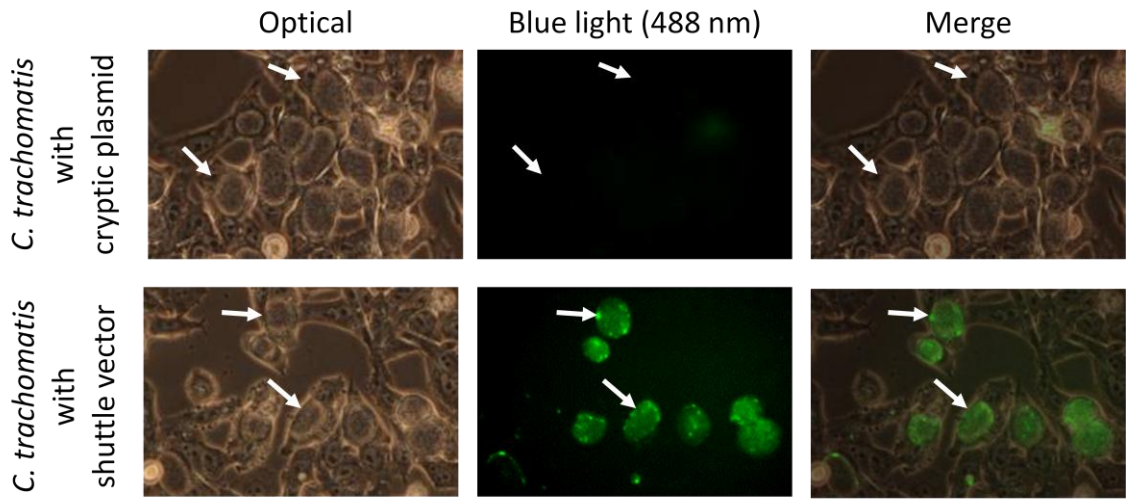


図 3　EGFP 発現性器クラミジアの HeLa 細胞感染像

性器クラミジア（MOI 1）で HeLa 細胞に感染させ、37℃、5%CO_2 条件下で 48 時間培養後に非固定のまま蛍光顕微鏡で撮影した。上段は潜在的プラスミドを有した野生株（with criyptic plasmid）、下段はシャトルベクター導入株（with shuttle vector）である。画像は左から、光学像（Optical）、蛍光像（Blue light）とこれら 2 枚を合成した画像（Merge）である。白矢印は HeLa 細胞内に形成された性器クラミジア封入体の一例を示している。

図 4

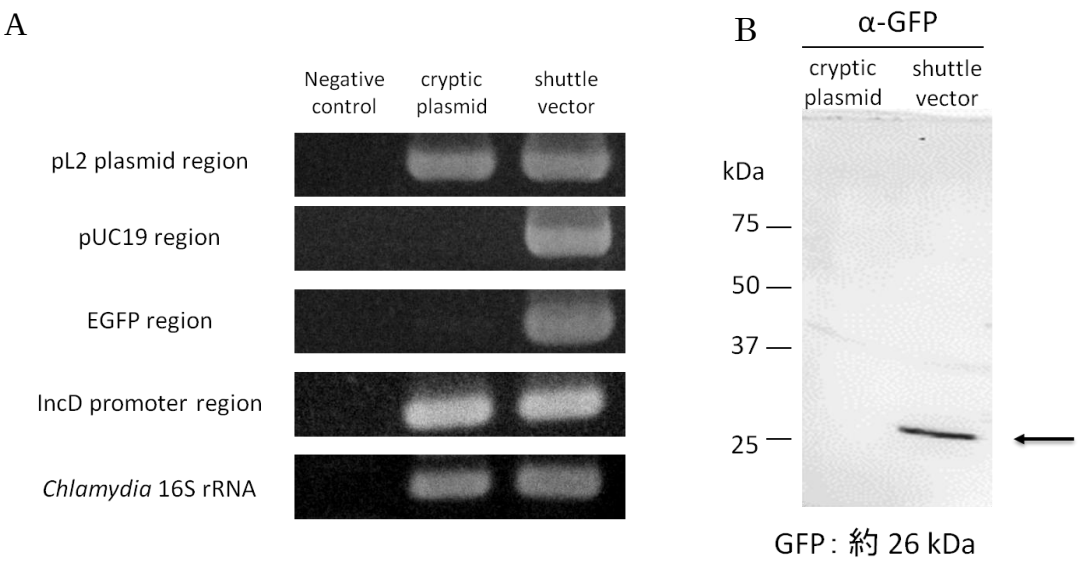


図 4　シャトルベクター導入性器クラミジア株のプラスミド導入確認と EGFP タンパク質発現の確認

性器クラミジア（MOI 1）で HeLa 細胞に感染させ、37℃、5%CO_2 条件下で 48 時間培養後に感染細胞を回収しサンプルとした。（A）サンプルからプラスミド遺伝子を FastGene Plasmid Mini Kit を用いて抽出し、Plasmid の各領域を PCR で増幅した。シャトルベクター導入株（shuttle vector）のみで pUC19 領域と EGFP 領域がそれぞれ存在していることが分かる。（B）サンプルを 2-メルカプトエタノールを含む還元緩衝液に溶かして熱処理後、SDS-PAGE で電気泳動した。ゲルは PVDF 膜にブロッティングし、5%（w/v）スキムミルクを加えた Tris リン酸緩衝液でブロッキングし、1 次抗体としてマウス抗 GFP モノクローナル IgG2b 抗体（Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan）またはウサギ抗ヒト α-tubulin 抗体（Sigma）を室温で 1 時間反応させた後、2 次抗体としてセイヨウワサビーペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG＋M（H+L）（Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA）抗体を室温で 1 時間反応させた。標識蛋白は Pierce® Western Blotting Substrate（Thermo, Rockford, IL）で可視化した。シャトルベクター導入株でのみ 26 kDa 付近（矢印）にバンドが検出された。

第 5 章

統括

5-1　生殖器粘膜面でウレアプラズマと混合感染することで得られる性器クラミジアの生存戦略

ウレアプラズマ（*Ureaplasma parvum*）は生殖器粘膜面に高頻度に存在する常在細菌であり、*Mycoplasmataceae* 科に属する細菌である。*Mycoplasmataceae* 科に属する細菌は性器クラミジア感染頻度を上昇させる可能性があるとされ、我々の以前の研究で、札幌の市中病院を受診した健常妊婦の膣サンプルから、性器クラミジアとウレアプラズマの混合感染頻度が有意に高いことを明らかにした。そこで、ウレアプラズマの存在が性器クラミジアの増殖に与える影響を探るために、HeLa 細胞にウレアプラズマと性器クラミジアを混合感染し、性器クラミジアの感染粒子数の変化を検討した。また、性器クラミジアに対する主要な生体内防御因子である IFN-γ の存在の有無でも、ウレアプラズマの性器クラミジアの増殖に与える影響を検討した。その結果、IFN-γ 非存在下ではウレアプラズマの存在によって性器クラミジアの増殖は抑制され、対照的に、性器クラミジアがウレアプラズマとの混合感染により、IFN-γ による増殖抑制効果に対して部分的に抵抗できることが明らかになった。また、この IFN-γ の効果を抑制する働きは、IFN-γ によるトリプトファンの枯渇経路に関係した IDO の発現量に影響を与えるものではなかった。性器クラミジアの感染増殖が劇的に進むことで宿主の免疫機構が活性化され、性器クラミジアの排菌が促進するが、IFN-γ 非存在下でウレアプラズマが存在することで増殖が緩やかになり、宿主の免疫機構から逃れやすくなるかもしれない。また、IFN-γ 存在下では、ウレアプラズマの存在により性器クラミジアの増殖が部分的に回復したことから、ウレアプラズマの存在が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での長期間の生存、増殖に有利な影響を与えている可能性が示唆された。以上の結果を性器クラミジアの増殖環の推移とともに図 1 にまとめた。一方で、IFN-γ 存在下でのウレアプラズマの性器クラミジア生存性に対する効果は、生菌と死菌で変化がなく、ウレアプラズマ菌体成分が直接あるいは間接的に性器クラミジアの生存性を高めている可能性もある。それ故に、ウレアプラズマの性器クラミジアに与える影響がどのような分子を介した現象で誘導されているのか、その分子の同定を含め検証が必要である。このように、本研究によって性器クラミジアが主要な感染部位である女性生殖器粘膜面において、常在する他細菌を利用して、性器クラミジアの生存性を高める存在として利用され生存性を高めている可能性が示唆された。性器クラミジアの新たな生存戦略と考えられる。

5-2　感染環境選択圧に対する細胞外膜タンパク質コード遺伝子の変異を介した病原性クラミジアの生存戦略

性器クラミジアによる性感染症は男女共に起こり、女性生殖器には常在細菌が存在しているなど、感染周囲環境が男性の泌尿生殖器と大きく異なっており、感染環境選択圧の違いが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い組織採取が困難であることに加え、性器クラミジアが持つ偏性細胞内寄生性による分離培養の際の細胞培養の必要性なども合わさり、性器クラミジア男性泌尿生殖器分離株を研究に使用することがこれまでなかった。そこで、本研究では細菌

表面分子の系統学的マーカーでもある多型性外膜タンパク質 Pmps ファミリータンパク質に注目して、男性泌尿生殖器分離株と女性生殖器分離株、同性愛男性直腸分離株の PmpF タンパク質の多型と配列保存性を解析した。PmpF は、アミノ末端シグナル配列と外膜に局在するカルボキシ末端 β-バレルドメイン、膜外に露出するパッセンジャードメインとヒンジ領域を持ち、外膜表面に露出するパッセンジャードメインには変異が生じやすいと考えられる。各株群間の配列比較解析の結果、男性泌尿生殖器株間では配列保存性が高く、株間の多様性が比較的少なかった。これは、直腸や女性生殖器膣環境には多数の常在細菌や一部の病原性細菌が存在している一方で、男性泌尿生殖器である尿道は基本的に無菌環境であり、男性泌尿生殖器では環境選択圧が比較的小さいことが影響している可能性がある。つまり、生物は周囲の環境に適応するために進化するため、同性愛男性直腸分離株群や女性生殖器分離株群に属する性器クラミジアは菌体外環境の選択圧が強く、菌体外膜に存在する PmpF の内で菌体外に露出するパッセンジャードメインが特に変異が起こりやすかったのではないかと考えられる。また、男性生殖器分離株の一つである性器クラミジア No.54 は血清型 B 型で、血清型分類では目に感染する群に属しており、血清型分類とは異なり生殖器から分離されたことから、他の男性生殖器分離株とも異なる遺伝子配列変異を有している可能性が考えられた。そこで、本研究では性器クラミジア No.54 のドラフトゲノム情報を取得し、多型性外膜タンパク質の遺伝子配列を既存の性器クラミジアゲノム配列と比較検討した。その結果、多型性外膜タンパク質の一つである *pmpB* 遺伝子配列が既存のどの性器クラミジアのとも似ていないというユニークな性質を有していたため、ドラフトゲノム情報を論文報告した。性器クラミジア No.54 の Pmps ファミリータンパク質以外のタンパク質に対する他の性器クラミジアとの比較は行っていないが、血清型分類の異所性感染部位から分離された株が本来とは異なる感染部位の環境選択圧に曝されたことにより特異的な遺伝子変異を生じた可能性がある。本研究においても、男性泌尿生殖器株は採取の困難さからサンプル数が少なく、少数しか得ることができなかったが、性器クラミジアが性差に伴う感染環境選択圧に適応するために、選択圧に直接曝される細胞外膜分子を形成する遺伝子に特異的な変異を引き起こしているという、病原性クラミジアの生存戦略の可能性の一端が示された。

5-3　病原性クラミジアの感染宿主細胞内生存戦略を紐解くための新規エフェクター候補遺伝子の探索と遺伝子導入技術について

病原性クラミジア（性器クラミジアや肺炎クラミジア）は宿主細胞に感染し、増殖するための細胞内生存戦略として、宿主細胞内環境を最適化するエフェクタータンパク質を巧みに利用していると考えられている。しかしながら、現在同定されているクラミジアエフェクターは細胞内でのクラミジアの生存、増殖の全てを説明することは不可能である。特に宿主細胞に感染、侵入し、封入体を形成するという劇的な形態変化を起こしていると考えられる感染初期に利用されているエフェクタータンパク質は Tarp 以外にほとんど同定されていない。それ故に、本研究では病原性クラミジアの細胞内生存戦略の一端を担うと考えられる、感染初期に利用しているエフェクタータンパク質の新規候補遺伝子を探索した。

その結果、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、これら新規エフェクター候補遺伝子がコードするタンパク質のほとんどが機能未知の仮想タンパク質に機能予測され、どのような働きを有しているのかは不明であった。これら仮想タンパク質の機能を調べることで性器クラミジアの感染様式や病態形成機構が詳細に把握できる可能性が示唆された。しかしながら、このような複数のエフェクタータンパク質を簡易的に機能調査する方法は、性器クラミジアに対しては現在のところ存在していない。そこで、これらエフェクター候補遺伝子の性器クラミジア感染細胞内での動態を簡易的に観察する方法論を確立するために、近年研究が進められてきている性器クラミジア遺伝子導入技術を応用して利用できるのではないかと考えた。標識タンパク質を融合したエフェクタータンパク質をクラミジア菌体内で発現させ、標識タンパク質を基にして検出することで、比較的簡易的にエフェクタータンパク質の局在を実験的に調査することができる。また、この標識タンパク質に緑色蛍光タンパク質（GFP）を使用することで、エフェクタータンパク質の感染細胞内での局在を生きたまま観察できる。そこで、本研究ではまず性器クラミジア高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP）発現株を作製し細胞内での発現に成功した。

5-4　今後の展望

第 1 章でも示したように、性器クラミジア感染症は現在もなお世界各地で猛威をふるっており、発展途上国での失明や先進国での不妊症などの深刻な症状を引き起こしている。性器クラミジアは偏性細胞内寄生性という性質と感染症の無症候性という特徴によって感染が拡大し、抗菌薬治療が可能であっても感染症を撲滅することが未だできていない。そのため、感染症を未然に防ぎ、感染拡大を抑制できるような抜本的な予防法の開発が望まれる。それ故に、性器クラミジアを含む病原性クラミジア生存戦略の正しい理解が必要不可欠であり、本論文では第 2 章から第 4 章までの 3 つの章を通して、病原性クラミジアの生体内での生存戦略の可能性の一部を示してきた。第 2 章では、「性器クラミジア感染局所でのウレアプラズマとの混合感染を介した微生物間相互作用による生存性の向上」、第 3 章では、「男性泌尿生殖器分離性器クラミジア株の細胞外膜タンパク質の遺伝子多型から、感染環境選択圧の違いに対する適応」、第 4 章では「生存戦略の一端を担う感染初期に利用する新規エフェクター候補遺伝子とその簡便な解析方法の提案」という複数のこれまでになかった視点から性器クラミジアの生体内での生存戦略に関わる研究を行ってきた。しかしながら、未だ調査しきれていない部分は多数存在している。例えば、「IFN-γ 存在下での性器クラミジア生存性の向上効果がウレアプラズマのどんな分子によって規定されているのか」、「女性生殖器粘膜面に存在するウレアプラズマ以外の微生物と性器クラミジアの相互作用はどうなのか」や「性器クラミジア感染部位の選択圧の種類と遺伝子変異の特異性」、「機能未知エフェクター候補遺伝子の機能同定と遺伝子導入法を用いたより簡易的エフェクター同定手法の妥当性」などは本研究では示し切れていない。今後、これらの問題点がすべて解決することができれば、クラミジア感染症に対する抜本的な予防法の開発に大きく貢献できると期待している。

第 5 章図

図 1

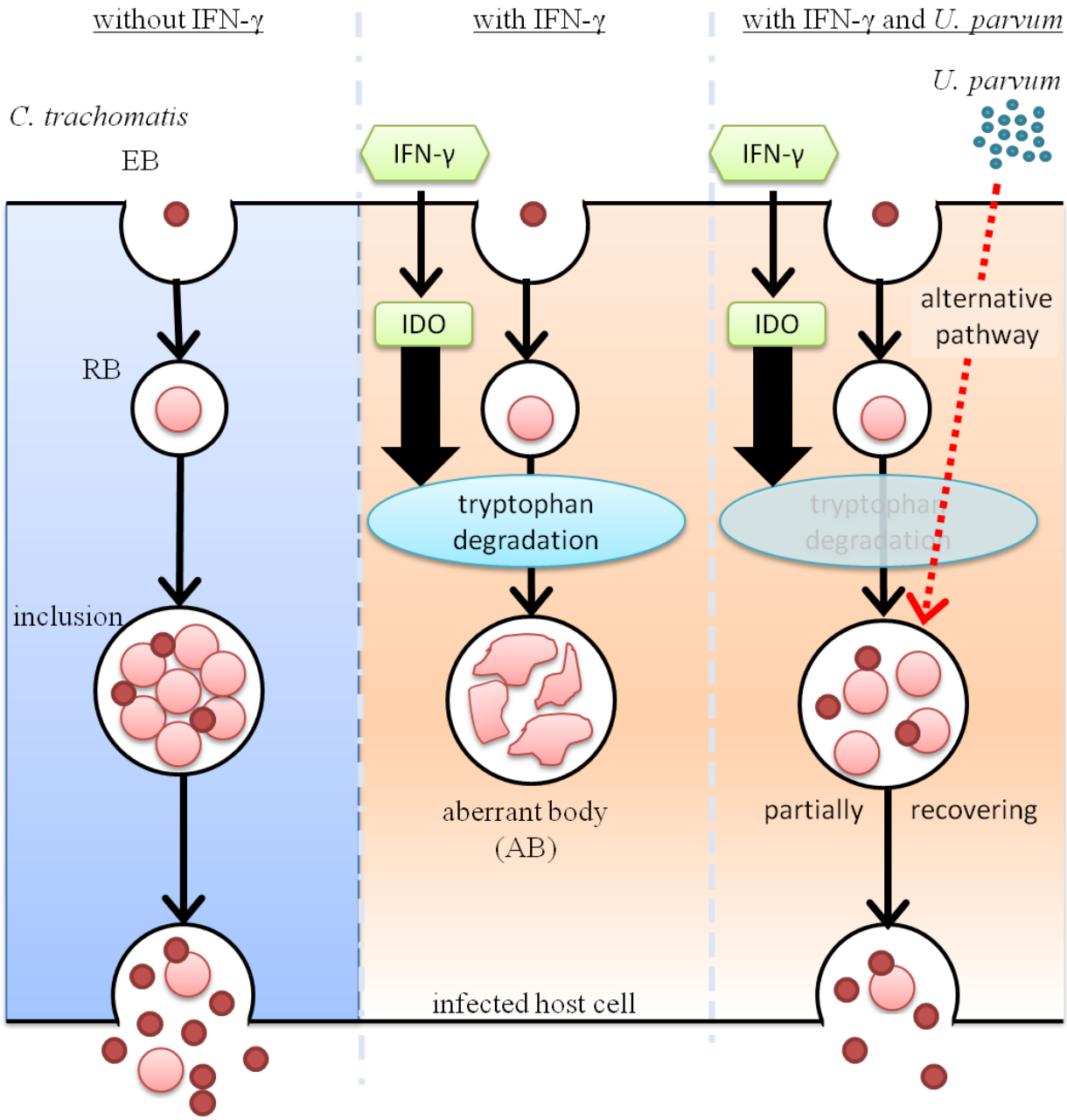


図 1　IFN-γ 存在下におけるウレアプラズマの性器クラミジアへの作用モデル

第 2 章で述べたように、IFN-γ 存在下ではインドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）を介したトリプトファンの枯渇により、性器クラミジアは正常に増殖できず異常体（aberrant body；AB）を形成するが、そこにウレアプラズマ（*U. parvum*）が存在するとクラミジアの増殖は部分的に回復する。この効果はウレアプラズマが直接的に IDO 発現に作用してはいないが、別の経路でトリプトファンの補充を担っている可能性がある。しかしながら、既知のウレアプラズマである近縁種の *U. urealyticum* のゲノム上にはトリプトファンの生合成経路は存在しなかった。

謝辞

本研究の全過程を通じ、直接御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野感染制御検査学教室山口博之教授、松尾淳司講師、大久保寅彦助教に厚く御礼申し上げます。更に、研究を進めるに際し、ご指導、御助言、御協力頂いた順天堂大学大学院医学研究科研究基盤センター細胞病理イメージング研究室中村眞二助教に深く感謝いたします。また、臨床女性膣検体の採取に御協力いただいた札幌東豊病院産婦人科南邦弘医師と同検査部阿部清孝技師長、ウレアプラズマの培養方法をご指導頂いた北海道大学大学院歯学研究科口腔医学専攻口腔病態学講座柴田健一郎教授、男性生殖器株の提供に御協力いただいた札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座高橋聡教授、性器クラミジア株群間のデータ解析に御協力いただいた北海道大学大学院保健科学研究院基盤看護学分野下田智子助教、ゲノム解析に御協力いただいたミヤリサン製薬株式会社高橋志達氏、岡健太郎氏、宮本健太郎氏に深く感謝いたします。最後に、北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野感染制御検査学教室の皆様には、本研究の様々な面にて多大なる御協力を頂きました。改めまして、ここに感謝の意を表します。

別冊

第 4 章

性器クラミジア EGFP 発現用プラスミドシャトルベクター配列

>pL2-UC19-IncD_prom-EGFP

TCCCTTGTACAATCAATTTACCGATTAAATAGTCTCTATAATTCACTATCCGGAGCGCTTC
AAAAAAAACTGTCCATTCCTGCTTAGAAATCGATTCTGTTTTGATTTTGTCTCGGATTTTA
AAAAATGTAGTGTTTCCAAAATCTTTCAATGGAATAGCGGGTTTAATATATCCCTTGGTCA
ATCTATACAAAAACTTTGTGAAAGATATGTAGCATGCCGCTCTAGCCTGTTTAGAGGCCT
CTGAAACGACTTTTCCATTAAAAACATCTAGAGACTTGATTTTAAACAAAGATTCGCTGT
GGTCAAGAGAAATAGCCTTTATCAAGGTTTCCGATAAATCCAGAATCTCTAAAGAAACA
AGAAAGTTAATCCCAGACGCATAATTTTTTCTAGTTAGATGAGATAAAGTAGATAACCAA
ATTTCCGACGCGTCCCCAAAAGTTAAGAACAACCTACTTTTATGGAAAGCCATCGAGCC
CATTTTCTTAACCAAAGCTATTCAAAATCGGAGCTCTAAGATTTTAAGAAATTTTTCAAC
AAAAGTCCATTATGACCAAGTCTACCACCAAGAGTTGCAAAGTCTACCACCAAGAGTTG
CAAAGTCTACCACCAAGAGTTGCAAAGTCTACCACCAAGAGTTGCAAATCTCTCTCGTA
AAATCAAATCCCTAAATATATATATATAATAGATATATATATGAGCTGACGGAGGATCAGCT
CTTTTGCTTAAAAAGTTCAAAAAGCTGTTGTAGAAGATTTTCGTTATAGGAGGACAAAG
AAACTCCGGAACACATGATGCGAAGTATCTCTATTAAGAAATCAGATAATTGGCGATTCT
TCTCTGAATCAGACTTATCTATCGTTTCTCTAACGTCTTTGTTTCTAGATGAAGGAAGAAA
TTGATCCAACACCCTTATCGCCGATGAGTTCGACATTCCACATACTTTCCCTATCACATCG
ACCTTGGTTTTTAAATCGCCTTTTCTAGCGGCCAAAATATATGCGGATTTATAGGGGATCG
ATTGAAACTCTTTTTGTAGAGTTTGGTTGGGGAGGTTTATAAAAAGCTCGTAATATGCAA
GAGCATTGTAAGCAGAAGACTTAGTTCTAAAAACTAACTCTATCCAAGATGAAAAAGTT
GTTGAGGAGAAGTGATCCTTACTCAGGATTTTTCTAGCATTATAGATTTTTTCTCCTAAAA
GAAGTACGTGTTGCTTCTGTATGGATTTTATCTGACCAGTAAGCAGTTTTACCGCTAGGAT
GTCTTCTTGATAAAATTCTTCATCCGAATAGTTTTGGGACTCTGATAAAAATAATTGATCC
AAACTCTGACTTTCCTCAGAATTCAAAGTTGCTGAGAATAGTTCAATGGAAGGAAGCGT
CTTCTTAAAATCTAAAGAAGCGGCAGTTTGATTTTTTTTAAAAAAGACATTCGCTTCTTT
TTTTAGTTTGTTCACGTTGTCCTCTGAGAGTAATCTCGTTCATATTCGATATGCAAAATATT
TGCTATTTCATGCGTTAACTTCAGAATATCTTCTGCGGCCCTAGAATTTGGATAGACATTA
GCTACAGAATCTTCTTTAAGAAGAGAACGGCTGAGAGAAATATCTCGACGAATTTTTGTT
GAAAAAAGCTTGTTTTTGTAAATAGACTCGATAATGTCTATATACATTTGGTTAGTCGAGT
TACGATCATCCCAAAAAGACAAAGCTATTCCAAGAATGTGTTCTTCTTCAGGTTTTCCGA
CCGAACTTAAGAATTCACGTATCTTTTGTAACCCTAGAATAGAAAAAGGTTCTGGAGTTA
AACAAGCAATTAATTTGTCTCCTGCAACAAAAGCTTCTTTCGTTAACCCTCCTAGGCTAG
GTGGAGTGTCTATTATGCAGATGTCATAAAAAGGAGCGCAGTACTCATTCAGAAATAACT
TTAAGTTGTTACTAGGTCCTCTATGAATATCCAATTCTCTAAACTGTTCGGATAAAAATGA
TGCAGGAATTAGGTCCACACTATCTTTTTTTGTTTCGCAAATGATTGATTTTAAATCGTTT
GATGTGTATACTATGTCGTGTAAGCCTTTTTGGTTACTTCTGACACTAGCCCCCAATCCAG
AAGATAAATTGGATTGCGGGTCTAGGTCAGCAAGTAACACTTTTTTCCCTAAAAATTGGG
CCAAGTTGCATCCCACGTTTAGAGAAAGTGTTGTTTTTCCAGTTCCTCCCTTAAAAGAGC
AAAAAACTAAGGTGTGCAAATCAACTCCAACGTTAGAGTAAGTTATCTATTCAGCCTTG

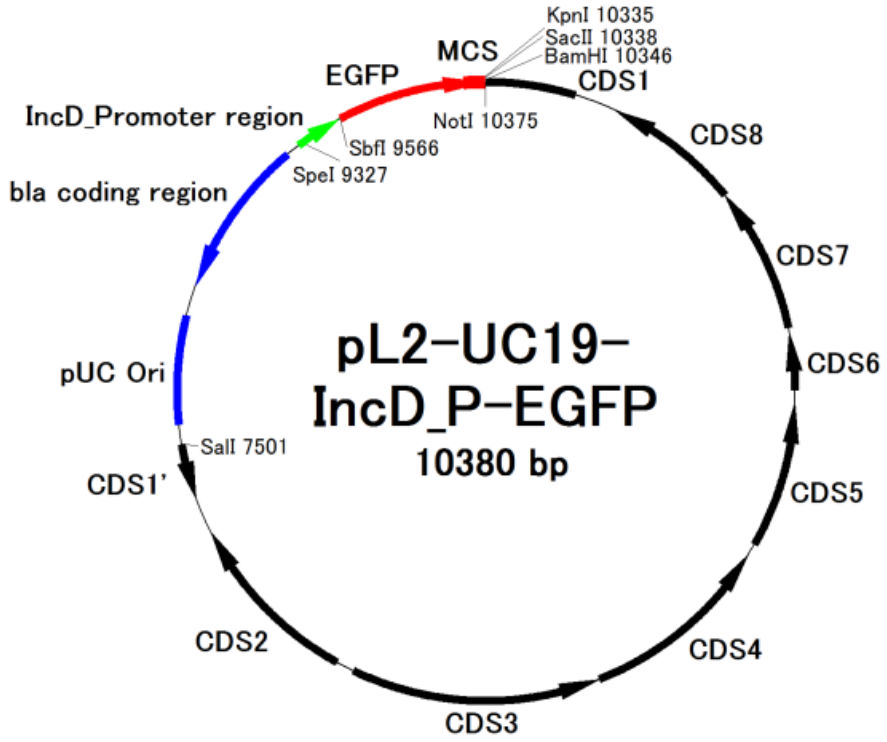
GAAAACATGTCTTTTCTAGACAAGATAAGCATAATCAAAGCCTTTTTTAGCTTTAAACTG
TTATCCTCTAATTTTTCAAGAACAGGAGAGTCTGGGAATAATCCTAAAGAGTTTTCTATTT
GTTGAAGCAGTCCTAGAATTAGTGAGACACTTTTATGGTAGAGTTCTAAGGGAGAATTTA
AGAAAGTTACTTTTTCCTTGTTTACTCGTATTTTTAGGTCTAATTCGGGGAAATCTTTTTT
CACATCTTTAACAATTTTAATAAAATCGTCCCTCACTTTGCTTTTATTTTGCATAACAAAC
CCCGTAATTCGAACTTTTTTCTCTAAATATAAAACCTATAAGAAAAATCCAATAAAAATTG
TTTAAGCGTTTGTTTGAGGTATTACCTCCAAAAAAGATACATTAGAAGTATTTGTTATTCC
TAAAATATCATTGCCATTAGAAAGGGCATTAACCCATACCACACCGCTTTCTAAACCGCC
TACACGTAATGAATACGTTGTCGGAGTCAATCCTGTATTAATAATTCTGGTTCTTAGACTA
CATAAATTAGGAACGCCTGATGAGTATCCATAACTAATCGCGTAGGGCTTAGAATCACCT
TCTCGTACCAAAGCTAGAACAACGCCGCCTTCCATTCTTGATGCAATAATATCTGCTGAG
ACTAAGAACATGCTCCCAGAGCTTTTGGGTGTGACTGTGAATTTTCCTATTTCAGTTCCT
CCTAATAAAGTTTCAATGTTCCTGGGAGTGAATAACCCGTTGCATTGAATTTTATTAGTGA
TTGGAAAGTTGTTAAAAGCTTTCAACAAACCTAGAGAAGGGTCTGTTGTGATTTTGTCT
AAAATATCTTGGACTGTACTATCAACAATAGTATCAGCAATTCCACCAAGAATTTGATCTC
CCAACTTTTCTAGAATAAGCTGGTAAGCTTTTTCCGCATCCAAACCAATTGTAATAGAAG
CATTGGTTGATGGATTATTGGAGACTGTTAAAGATATTCCATCAGAAGCTGTCATTTTGGC
TGCGACAGGTGTTGATGTTGTCCCAAGGATTATTTGCTGGTCCTTGAGCGGCTCTGTCAT
TTGCCCAACTTTGATATTATCAGCAAAGACGCAGTTTTGAGTGTTATACAAATAAAAACC
AGAATTTCCCATTTTAAAACTCTTTTTTATTTTGAGCTTTAAATAAATTAGGTTTTTAGTTT
CAAGTTTGCTATTAATTAATAGATTCTTGTTCTAATTGTTCCATTTGTTCTTTAGATTTCTTA
GTTATTTCTTCAAAACGCTCTTTATTTAGATATAGAATTTCTTTTTTAGAGAGTTTAGAAG
AATCCAGAAATTCAATGCGTTTTCTTCTAGATAACCAACCAAGCTGAATGGCGATTTCTAT
ACATTTATCGATAGCTAACTCGATTTTTTTCCAGTTCCTTGTACAAATGTACCGATTCATCC
TTAAAATATATGCAAGACTTTTAACGTTAACGTTTAAGAACAAGTTTTCTGGCCAAGAAT
TATCCTTAGTTAATTTTCGTCTCTTTTTCGCAGCTGCTGTAATCACCCAGTCGATAAATGT
GTAAGCATACTTTGATGCATTTGGGAAGCGCATTTTTATTTCTTGGTATACATTTGCAGGC
TTGATTACAAAGTAGGATTCTATTTGATCTACCAAGATAGGACATGGCTCTACAACGAAC
CCTTTATGTTTCCGTGTAGATGGTGAATTAAAAGGTGTTAAGTCTATATCTATATTTTCTTC
GTCAGTTAAACCTTCCCATCCTTCGTAAATCCTAATGATCGGAGAAAGAGTTTGGTAACG
GTCTACTATTTGTGTTCCATTAGTCCATCGAGTTCTAGTTGCCACTATTAAAAACGGTTGA
TGTCCTAAATGGTATAAGGCTTCTAAAGCAGTTTCAGCTTCTTTTCCACTAAACTCATACT
TATTTCTGGATGTTTTATACCGCTTAACTCCATAAGCCTCTAAGAATTCAGTTTTTGTAAA
ACGGATTCTTGGTATCCATCCTTCAAATTGAAAACTATTTGATTCTCTGGATAAAACAACC
CCTTTTGTGTTCCCCTTGTAATTCGTTGCAGTCAGCAATCTTTGGATAGCTGCTAATGCAT
GGTAATGAGATGAAAGAAAATCAAGACCTATAACTTCTACCATCCCATTTTGAGCCAATT
TGGGAGATATCTTAATAGATTGACCAGGTCTTCTTCCAAACTTCTGATTTTCAAGGTGGAT
AGGACTTTTGATGAAGTGGCAGTTACTATAATTTACCATACTTTTTTAATAGCGGAGAATT
TACTAATTTTTGGATCGAAATGTAATACCGAAGAGAAAACCGATCCATGTCTATTTTTCCC

AACAGTTATCTCACAATTAGAAGACGATTCCTTCCTATTGATAAACAAAATCACATCTGC
GTCTTGCTCTATTTGACCGCTGTCTCGCAAATCTGAAAGCATGGGAACTTTATTTGCTCTA
TCCTCAACTTTTCTAGATAGTTGGGATAAACAAACTATAGGAATGTTTAGCTCTGAGGCT
AAACCTCTTAAGGTTCTAGATATATCTGCTATTTCATTTTGACGATTTTCTCCAACCGATG
AGTTGATCAACTGCAAGTAATCGATAAATATTACGTCTACTCGATCTTCTTTTCTCAGCAA
CCGGATCTGATTCGCGATTAAATTAAGCTTATACTGACTATCACTGCAGATATAAAAATGT
GATTCTCTAACTGTTTCTCCAGCTTCTTCTACTCGGAATAATTCTTCTTTAGAGAGATCCC
CTCTTTGTAATTTTTCACCAGATATTCCTGTTAAATTAGCAATAATCCGCTCAACAATTTG
ACCTGCGCTCATTTCTAGAGATAGGAAACCAACTCTACGCTGTTGAGTAACCGCAAGAT
TTATCGCCATGTCTATAGCTAAAGCAGTTTTCCCTATAGATGGCCTAGCTGCTATAATCAC
GAAATTACCTTTAGCTAAGATAACTCCTTTATCATCAATATCCTTGTATCCTGTTGGGAAG
GCATCAAAGAAAGAATTTTGATTCTCAGAGAACGTTGCTCGTCTTTTTTTTATACGAGCC
AGCACTCCAATTTCTGACTGTGAGAATATATCATAAATAGACCGGCCTCTAGCGCTGCGA
ATAGAAAAAGTCTTTGCTATAGCACTGTCAAGCCTTCCCTTTATACGCTCAAGCAATAGA
AACGGAGATCTACGCAATGGATTTTCATTGTACTCATTAAACGAGCGGAAAATGAAATTA
CTCAAATTTTCTTCAGCGCTACACACGCTCAAATCATCGAGGAAAACCGTATGAGAAAC
GGATCTAAGCTTGTCATTTGATAAAGCATCATGCAACATTAACCCGAGATACGATTTGTCC
ATATCTTTGATACGACGCCGCAAAAGCTCTTCCCAAGCCGAGTCTACAGTTATAGGTAAT
CCATTGTCTTTTAAGTATTTAAATACTATGAATATGTTTTTATGATGAGAACACTTAAACTC
ATAATTAGCAAGCTGCCTCAGAATATACTCAGTAGAGTCTTCAAATATCAGAGCTTTACCT
AACAACGCATACTCGATATCTTGCATGCGATTTTCTATTTCGGAACGAGTTTTCATGTTTAT
ATAAAAAAATACCGAGCGTGCTATCCTGTTAACAACCTGATTATTTCACTAATCAGGACA
TTTTACGGATAGGTTATATCACGAGGGATTTCATGGGTAAAGGGATTTTATCTTTGCAGCA
AGAAATGTCGTTAGAATATAGCGAAAAGTCTTATCAGGAAGTTTTAAAAATTCGCCAAG
AATCCTATTGGAAACGCATGAAAAGCTTCTCCTTATTCGAAGTTATTATGCATTGGACCGC
ATCACTCAACAAACATACTTGTAGATCATATCGAGGATCTTTTTTGTCTTTAGAAAAGATT
GGTCTATTGTCCTTGGATATGAATCTGCAAGAGTTTTCCCTTTTAAATCATAATCTAATTCT
AGATGCGATTAAAAAAGTTTCCTCTGCCAAGACTTCTTGGACCGAAGGTACTAAACAAG
TTCGAGCAGCAAGCTATATTTCCTTAACAAGATTCCTAAACAGGATGACTCAAGGAATAG
TCGCTATAGCGCAACCTTCTAAACAAGAAAATAGTCGAACATTTTTTAAAACCAGGGAA
ATAGTAAAAACAGATGCGATGAACAGTTTGCAAACAGCGTCCTTCCTAAAAGAGCTAAA
AAAAATCAATGCCCGGGATTGGTTGATCGCCCAGACAATGCTCCAAGGAGGTAAACGCT
CCTCTGAAGTCTTAAGCTTGGAGATTAGTCAGATTTGTTTCCAACAAGCTACCATTTCTT
TCTCCCAGCTTAAGAACCGTCAGACAGAAAAGAGGATTATTATAACTTATCCTCAGAAGT
TTATGCACTTTCTACAAGAGTACATCGGTCAACGAAGAGGTTTTGTCTTCGTAACTCGCT
CCGGAAAAATGGTGGGGTTAAGGCAAATCGCCCGCACGTTCTCTCAAGCAGGACTACA
AGCTGCAATCCCTTTTAAGATAACCCCGCACGTGCTTCGAGCAACCGCTGTGACGGAGT
ACAAACGCCTAGGGTGCTCAGACTCCGACATAATGAAGGTCACAGGACACGCAACCGC
AAAGATGATATTTGCGTACGATAAATCTTCTCGAGAAGACAACGCTTCAAAGAAGATGG

CTCTAATATAGCCTAAAAGTGTTTTTTCTGGCAACAGAATATGAATATAATTTTAATTATAT
CACAATATTGGGGGTGTTTGTACTAGAGGACTTACCTCTTCCCCAGAACAATAAGAACAC
ACACTTTGTCTCGATGAAAGACAGGAAATACGCATGATTTCCTCATCTTTTAATCCTATTT
GCTTTAAATGAATCAAAGCGCTTGCACGAAGTACTCTAGGAGTAATTTTTTTTTCATAGC
ACTATAGAACTCTGCAAGCCTAAAATTATGCGCAACCTGACTTGTTGTTACAGGAATCCC
TATTTTAGAAACAAATACTCTCCCATTTCTCCCACAAGTGTATTTTTGCAACTCCTCCATT
AAGCTGATAGGAAATGTGATTAGAATTTTGGTTTCTTTATTCTGTCTTTTTTTAATGCGAA
AGGAAATCTGATTGGATGCAAAAAATAGATCGTCTGTGCGCAAAGACAAAATTTCGTCT
AACTTACGGAGTCGACTACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAT
GTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTT
TTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTG
CGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGA
AGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGC
TCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGG
TAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA
CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGG
TGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCA
GTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAG
CGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAG
ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGG
ATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAA
GTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAT
CAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCC
GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATA
CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAG
GGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG
CCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGC
TACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCA
ACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCG
GTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAG
CACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTA
CTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGT
CAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAAC
GTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGA
GCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGT
TGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCAT
GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTACTAGTAACGG

AGCCTTCTAGCTATTTTGTAAATATTTTAACAATTTAGATTCTTCAAAGCTCAGCGAGGGC
GTGAAGAATCTTGTTCAGGTGTATTTGAAAAAAGTTTGTTTTAAATAGTTTTTTTAGTTAA
AATGGGTCCCTAAATAATTTAAATCCGGTAGTTTTTGCGTCCGAAACATTGTTTTATAAGT
GAGAAATGAGATCTGGCTAAAATCTGTCGAAGTGAGGTTTCCTGCAGGATGGTGAGCAA
GGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA
AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGC
TGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTG
ACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCA
CGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCA
AGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGG
TGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCA
CAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
AACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC
TCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGA
CAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAT
CACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCT
GTACAAGTCCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCG
CGGGCCCGGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCAGCGGCCGC

pL2-UC19-IncD_Prom-EGFP	10380 bp	Plasmid position (bp)
pL2 ORF		
CDS1(pgp6)		484→1, 7499→7201
CDS2(pgp7)		6024→7003
CDS3(pgp8)		5925→4570
CDS4(pgp1)		4569→3512
CDS5(pgp2)		3450→2656
CDS6(pgp3)		2586→2278
CDS7(pgp4)		2250→1456
CDS8(pgp5)		1459→716
pUC19		
bla coding region		9225→8365
pUC ori		7606→8194
pEGFP		
EGFP		9568→10365
MCS		10258→10372
Chlamydia trachomatis L2 434/Bu		
IncD_promoter_region		9302→9559



業績リスト

1. 著書

なし

2. 学術論文

① Ishida K, Yamazaki T, Motohashi K, Kobayashi M, Matsuo J, Osaki T, Hamawa T, Kamiya S, Yamamoto Y, Yamaguchi H. Effect of steroid receptor antagonist RU486 (mifepristone) on *Chlamydophila pneumoniae* in IFNγ-induced persistent infection model with epithelial HEp-2 cells. *Journal of Infection and Chemotherapy.* Volume 18, Number 1. pp 22-29. Feb. 2012.（査読あり）

② Yamazaki T, Matsumoto M, Matsuo J, Abe K, Minami K and Yamaguchi H. Frequency of *Chlamydia trachomatis* in *Ureaplasma*-positive healthy women attending their first prenatal visit in a community hospital in Sapporo, Japan. *BMC Infectious Disease.* Volume 12, Number 82. Apr. 2012. （査読あり）

③ Matsuo J, Nakamura S, Ito A, Yamazaki T, Ishida K, Hayashi Y, Yoshida M, Takahashi K, Sekizuka T, Takeuchi F, Kuroda M, Nagai H, Hayashida K, Sugimoto C, Yamaguchi H. *Protochlamydia* induces apoptosis of human HEp-2 cells through mitochondrial dysfunction mediated by chlamydial protease-like activity factor. *PLoS One.* Volume 8, Issue 2, e56005. Feb. 2013. （査読あり）

④ Sampo A, Matsuo J, Yamane C, Yagita K, Nakamura S, Shouji N, Hayashi Y, Yamazaki T, Yoshida M, Kobayashi M, Ishida K, Yamaguchi H. High-temperature adapted primitive *Protochlamydia* found in *Acanthamoeba* isolated from a hot spring can grow in immortalized human epithelial HEp-2 cells. *Environmental Microbiology.* Volume 16, Number 2, pp 486-497. Feb. 2014. （査読あり）

⑤ Ishida K, Sekizuka T, Hayashida K, Matsuo J, Takeuchi F, Kuroda M, Nakamura S, Yamazaki T, Yoshida M, Takahashi K, Nagai H, Sugimoto C, Yamaguchi H. Amoebal endosymbiont *Neochlamydia* genome sequence illuminates the bacterial role in the defense of the host amoebae against *Legionella pneumophila*. *PLoS One.* Volume 9, Issue 4, e95166. Apr. 2014. （査読あり）

⑥ Yamazaki T, Matsuo J, Nakamura S, Oguri S, Yamaguchi H. Effect of *Ureaplasma parvum* co-incubation on *Chlamydia trachomatis* maturation in human epithelial HeLa cells treated with interferon-γ. *Journal of Infection and Chemotherapy.* Volume 20, Number 8, pp 460-464. Aug. 2014. （査読あり）

⑦ Yamane C, Yamazaki T, Nakamura S, Matsuo J, Ishida K, Yamazaki S, Oguri S, Shouji N, Hayashi Y, Yoshida M, Yimin, Yamaguchi H. Amoebal endosymbiont *Parachlamydia acanthamoebae* Bn9 can grow in immortal human epithelial HEp-2 cells at low temperature; an *in vitro* model system to study chlamydial evolution. *PLoS One*. Volume 10, Number 2, e0116486. Feb. 2015. （査読あり）

⑧ Yamaguchi H, Matsuo J, Yamazaki T, Ishida K, Yagita K. Draft genome sequence of high-temperature-adapted *Protochlamydia* sp. HS-T3, an amoebal endosymbiotic bacterium found in *Acanthamoeba* isolated from a hot spring in Japan. *Genome Announcements.* Volume 3, Number 1. e01507-14. Feb. 2015. （査読あり）

⑨ Matsuo J, Nakamura S, Takeda S, Ishida K, Yamazaki T, Yoshida M, Chiba H, Hui SP, Yamaguchi H. Synergistic costimulatory effect of *Chlamydia pneumoniae* with carbon nanoparticles on NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1β secretion in macrophages. *Infection and Immunity.* Volume 83,

Number 7, pp 2917-2925. Jul. 2015. （査読あり）

⑩ Yamazaki T, Matsuo J, Takahashi S, Kumagai S, Shimoda T, Abe K, Minami K, Yamaguchi H. A characteristic of polymorphic membrane protein F of *Chlamydia trachomatis* isolated from male urogenital tracts in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy.* In press, corrected proof. S1341-321X(15)00199-3. Sep. 2015. （査読あり）

⑪ Yamazaki T, Matsuo J, Kikuchi M, Miyamoto K, Oka K, Takahashi M, Takahashi S, Okubo T, Yamaguchi H. Draft genome sequence of *Chlamydia trachomatis* strain 54, isolated from the urogenital tract of a male in Japan. *Genome Announcements.* Volume 3, Number 5. e01242-15. Oct. 2015. （査読あり）

⑫ Oguri S, Hanawa T, Matsuo J, Ishida K, Yamazaki T, Nakamura S, Okubo T, Fukumoto T, Akizawa K, Shimizu C, Kamiya S, Yamaguchi H. Protozoal ciliate promotes bacterial autoinducer-2 accumulation in mixed culture with *Escherichia coli*. Volume 61. Number 5. pp 203-210. *J Gen Appl Microbiol*. Nov. 2015. （査読あり）

3. 総説・解説

なし

4. 学会発表

① 山﨑智拡、松本めぐみ、松尾淳司、中村眞二、阿部清孝、南邦弘、山口博之、性器クラミジアとマイコプラズマならびにウレアプラズマとの混合感染が細胞に与える影響、日本細菌学会北海道支部学術懇談会リレー研究発表会、札幌、2011 年 12 月（口頭発表）

② Yamazaki T, Matsumoto M, Matsuo J, Nakamura S, Yamaguchi H. Impact of *Ureaplasma parvum* on *Chlamydia trachomatis*-genital infection、第 85 回日本細菌学会総会、長崎、2012 年 3 月（ポスター発表）

③ Yamazaki T, Matsumoto M, Abe K, Minami K, Matsuo J, Yamaguchi H. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma* species in healthy women. 112th General Meeting American Society for Microbiology. San Francisco, California, USA. June, 2012.（ポスター発表）

④ 山崎智拡、庄司なつみ、松尾淳司、中村眞二、阿部清孝、南邦弘、山口博之、*Chlamydia trachomatis* と *Ureaplasma parvum* の混合感染について、第 79 回日本細菌学会北海道支部学術総会、帯広、2012 年 8 月（ポスター発表）

⑤ Yamazaki T, Matsuo J, Nakamura S, Yamaguchi H, *Ureaplasma parvum* attenuates effect of IFN-gamma on *Chlamydia trachomatis* growth inhibition. 第 86 回日本細菌学会総会、千葉、2013 年 3 月（ポスター発表）

⑥ Yamazaki T, Matsuo J, Nakamura S, Yamaguchi H. *Ureaplasma parvum* stimulation prompts *Chlamydia trachomatis* growth in HeLa cells treated with IFN-γ. 113th General Meeting American Society for Microbiology. Denver, Colorad, USA. May, 2013. （ポスター発表）

⑦ 山﨑智拡、松尾淳司、山根千夏世、林泰弘、中村眞二、石田香澄、山口博之、温泉分離株 *Acanthamoeba* HS-T3 に共生する原始クラミジア *Protochlamydia* のヒト上皮系株化細胞内での増殖、第 80 回日本細菌学会北海道支部学術総会、網走、2013 年 8 月（口頭発表）

⑧ 山﨑智拡、松尾淳司、山根千夏世、山保文、庄司なつみ、林泰弘、中村眞二、石田香澄、八木田健

司、山口博之、温泉より分離された HS-T3 アメーバに共生する *Protochlamydia* のヒト上皮系細胞 HEp-2 への感染、第 31 回日本クラミジア研究会学術集会、札幌、2013 年 9 月（口頭発表）

⑨ Yamazaki T, Sampo A, Matsuo J, Yamane C, Nakamura S, Ishida K, Yagita K, Yamaguchi H. *Protochlamydia* found in high-temperature adapted HS-T3 *Acanthamoeba* isolated from a hot spring can proliferate in human epithelial HEp-2 cells. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology. Tokyo, Japan. March, 2014. （ポスター発表）

⑩ Yamazaki T, Matsuo J, Yamane C, Nakamura S, Ishida K, Yamaguchi H、*Protochlamydia* found in HS-T3 amoebae isolated from a hot spring can grow in immortalized human epithelial HEp-2 cells、第 87 回日本細菌学会総会、東京、2014 年 3 月（ポスター発表）

⑪ Yamazaki T, Sampo A, Matsuo J, Yamane C, Nakamura S, Ishida K, Yagita K, Yamaguchi H. High-temperature adapted amoebal endosymbiont *Protochlamydia* found in HS-T3 *Acanthamoeba* isolated from a hot spring can grow in immortalized human epithelial HEp-2 cells. 114th General Meeting American Society for Microbiology. Boston, Massachusetts, USA. May, 2014. （ポスター発表）

⑫ 山﨑智拡、松尾淳司、山口博之、病原性クラミジアの III 型分泌装置新規エフェクターの探索、第 81 回日本細菌学会北海道支部学術総会、札幌、2014 年 8 月（口頭発表）

⑬ Yamazaki T, Matsuo J, Yamaguchi H. Computational prediction of novel type III effectors in pathogenic Chlamydiae. 第 88 回日本細菌学会総会、岐阜、2015 年 3 月（ポスター発表）

⑭ Yamazaki T, Ohba H, Takagi N, Matsuo J, Yamaguchi H. *In silico* prediction of novel effectors secreted by type III secretion apparatus of pathogenic chlamydiae. The 2nd FHS International Conference. Sapporo. July, 2015.（口頭・ポスター発表）

⑮ 山﨑智拡、松尾淳司、大久保寅彦、中村眞二、山口博之、GFP 発現 *Chlamydia trachomatis* 変異株の確立、第 89 回日本細菌学会北海道支部学術総会、札幌、2015 年 9 月（口頭発表）

5. その他

I. 学会賞の受賞

① The 2nd FHS International Conference. Sapporo. July, 2015. 口頭・ポスター発表、Best Presentation Award 受賞

II. 保健科学院で認められた業績

① 北海道大学大学院保健科学院研究奨励賞、2015 年 6 月

II. 研究費の取得状況

① 学術振興会特別研究員 DC1 特別研究員研究奨励費、「混合感染が病原性クラミジアの細胞修飾機構に与える影響とその分子基盤の解明」、2013 年 4 月~2016 年 3 月、各年 120 万円、研究代表者