

# 学位論文審査結果の報告書

氏 名 Md. Abdul Aziz

生 年 月 日 昭和・平成 58年 2月 2日

本 籍 (国籍) バングラディシュ

学位の種類 博 士 (工 学 )

学位記番号 生 第 47 号

学位授与の条件 学位規程第5条該当  
(博士の学位)

論 文 題 目 \_\_\_\_\_

Study on the regulation of host apoptosis and apoptotic factors by *Chlamydia* infection

学位論文受理日 2018年 1月 24日

学位論文審査終了日 2018年 2月 7日

審 査 委 員

(主 査) 東 慶直 教授 

(副主査) 秋田 求 教授 

(副主査) 松本和也 教授 

(副 査) 

(指導教員) 秋田 求 教授 

*Chlamydia pneumoniae* is an obligate intracellular pathogen and can replicate solely within a membrane-bound vacuole termed an inclusion. *C. pneumoniae* can cause acute and chronic respiratory diseases, including pneumonia and bronchitis, and its chronic infection is widely considered to be a cause of atherosclerosis, asthma, Alzheimer's disease and other inflammatory processes. *Chlamydia* perturbs multiple cellular processes of the host to facilitate their survival and evade the host immune surveillance, such as host cell apoptosis. Apoptosis is an active process of cellular suicide triggered by a variety of stressors and physiological stimuli for tissue development and homeostasis of organisms. *C. pneumoniae* was reported to inhibit apoptosis induced by staurosporine (STS) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in infected epithelial cells, macrophages and monocytes. But the precise mechanisms by which *C. pneumoniae* regulates host cell apoptosis remain unknown.

In our first attempt to clarify host and chlamydial factors involved in apoptosis regulation, it has been found that Apaf-1 and caspase-9 inhibitors were shown to increase and decrease *C. pneumoniae* infection, respectively. But no effects were observed by caspase-8 and -3 inhibitors or Bcl-2 over expression. These opposite effects by Apaf-1 and caspase-9 inhibitors were confirmed using *apaf-1*<sup>-/-</sup> and *caspase-9*<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblasts (MEFs) as host cells. Moreover caspase-9 was activated without activation by Apaf-1, and accumulated within chlamydial inclusions. The sequestration of caspase-9, which means physical disconnection from the caspase cascade, by *Chlamydia* seems to result in apoptosis repression. As an interesting observation, caspase-9 inhibitor could diminish chlamydial infection. Thus there are crucial queries remained, such as which chlamydial proteins are involved in the sequestration of caspase-9 on the chlamydial inclusions and are affected by caspase-9 inhibitor in the inclusions.

As our next attempt to clone chlamydial genes, which products can interact with human caspase-9, a screening using a yeast two-hybrid system was performed. We have constructed the genomic library including 1065 genes of *C. pneumoniae* by homologous recombination method and analyzed interaction with caspase-9. We found chlamydial proteins Cpj0056, Cpj0444, Cpj0512, Cpj0838 and Cpj0948 to positively interact with caspase-9. Pull-down experiments showed that caspase-9 physically bound to the Cpj0838 product and chlamydial cells (EB). These interactions may provide a valuable clue regarding the mechanism for Apaf-1-independent activation of caspase-9 supporting chlamydial multiplication in parallel with apoptosis repression by the caspase-9 sequestration. Using gene annotation chlamydial 47 outer membrane protein coding genes were selected for screening interaction with human aorta cDNA library. Human aorta cDNA library were individually transformed into the yeast strains AH109 carrying pGBKT7 vector cloned

with chlamydial 47 outer membrane genes. Chlamydial 22 outer membrane proteins found to interact with 74 human proteins.

## 論文審査結果の要旨

Md. Abdul Aziz君の博士論文「Study on the regulation of host apoptosis and apoptotic factors by *Chlamydia* infection」は、日本で分離された肺炎クラミジアの感染によって宿主となるヒト細胞のスタウロスポリン誘導アポトーシスが抑制されること、その原因がアポトーシスを実行するcaspase-9がクラミジアの封入体に取り込まれ、クラミジアの増殖に利用されていることを明らかにしている。興味深いこととして、caspase-9と同様にアポトーシスを実行するApaf-1は、caspase-9とは逆にクラミジアの感染に対して抑制的に作用することが示されている。微生物感染に対して抑制的に作用するNod1とApaf-1の構造的類似性はその1つの根拠となっている。残念ながら本論文ではさらなる追求はなされていない。一方、caspase-9がクラミジアの封入体に取り込まれ、Apaf-1非存在下でもクラミジア感染によって活性化され、クラミジア感染に必要であるという発見に基づき、caspase-9と相互作用するクラミジアの蛋白質の探索が酵母2ハイブリッド法によって行われた。肺炎クラミジアが有する約1000遺伝子を個別にクローン化し、スクリーニングされた結果、クラミジアの外膜蛋白質遺伝子など合計5つの遺伝子が選択された。グリコーゲン合成に係わる2遺伝子がcaspase-9と相互作用する因子として同定されたことは、クラミジアの増殖とグリコーゲンの必要性、caspase-9による制御など大きな発展を期待させる発見である。本論文では、さらにcaspase-9と外膜蛋白質遺伝子の相互作用に啓発され、クラミジアの47外膜蛋白質遺伝子を持ちいて、相互作用するヒトの遺伝子のスクリーニングが実施されている。封入体中の蛋白質生態系を示す興味あるデータ群である。

本論文は、全文が英語で表記され、主として4章Introduction(イントロダクション)、Materials and Methods(方法と材料)、Results(結果)、Discussion(考察)からなる。Introductionには本論文での研究対象であるクラミジアに関するその生態的特徴、それが原因となる疾患、疾患の原因となるクラミジアが有する病原因子について、適切な引用文献を以て非常に丁寧に説明している。それらは本論文において命題となるクラミジアによる持続感染により起こると考えられる動脈硬化とその疾患の原因の1つ考えられる感染宿主のアポトーシス制御を適切に導き出していると考えられる。また、これまでに知られているクラミジアによる感染宿主のアポトーシス制御、ならびにクラミジア因子と宿主因子の相互作用について、最新の知見を公正に引用しながら説明している。研究全体の目的や意義についての説明が不十分な感じが否めないが、個々の研究に関する目的は良く把握できている。非常に他種類の細胞やベクター、DNAプライマー、阻害剤、抗体を用いた実験がなされているが、材料についてはそれらが欠くことなく掲載されている。方法についても、細胞の取扱い、クラミジア感染、大腸菌や酵母を用いた分子生物学的方法など、Md. Abdul Aziz君の研究を網羅するものとなっている。彼の実験を参照するこれからの学生には大いに役立つ百科事典と言える。残念な点としては、遺伝子名と蛋白質名の表記における細かな間違いなどが散見された。今後国際誌に論文を自ら投稿していく上で踏襲すべき「典型的な形式」をしっかり理解し、適切な表現を身につけて頂きたい。ただし、その注意点は論文の内容を鑑みるとき極めて些細な点であり、審査結果を左右するものでは全くない。研究内容は3章に区分され、全体としてクラミジア因子とヒト因子の相互作用の解析である。第1章はクラミジア感染と宿主アポトーシス因子、第2章はカスパーゼ9と相互作用するクラミジア因子、第3章はクラミジアが有する全外膜タンパク質とヒト因子との相互作用の解析である。Md. Abdul Aziz君はいずれの結果についても、研究の目的と方法を要約して記載した上で、適切に結論を記述している。また、必要な図や表を国際的な雑誌への投稿に類する方法で記載している。論理的な矛盾を感じる点はなく、研究全体の戦略がよく練られていたことが伺える。ただし、考察の項目において、スクリーニングによって得られた遺伝子群を再構築して、如何なる現象がクラミジア感染で起きているかをモデル化できていないように感じられた。この点は、今後研究を発展させる中で是非とも養って頂きたい。

以上のように、本論文はクラミジア因子とヒト因子の相互作用の解析という重要な問題を解決するための遺伝子ネットワークにおけるクラミジアとヒトの因子の候補を得る重要な研究である。第一に宿主アポトーシス因子であるApaf-1がクラミジア感染の抑制機能を有すること、Caspase-9がクラミジア封入体内でクラミジア感染に必要な機能を持つことを示している。さらに、Caspase-9と相互作用するクラミジア因子の候補を抽出し、その1つが外膜タンパク質であったことから、クラミジア封入体内のクラミジア因子とヒト因子のネットワークをインターラクトーム解析によって明らかにした。クラミジア感染制御への発展も想起される重要な研究でもあることから、本論文は博士(工学)論文として価値あるものと認める。