

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07558

研究課題名(和文)核内構造変化から読み解く新たなクラミジア感染制御機構

研究課題名(英文)Analysis of nuclear structure on chlamydia infected cells

研究代表者

鈴木 倫毅 (Suzuki, Michitaka)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80456649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：性感染症を引き起こすクラミジアは、宿主細胞の機能を巧妙に支配することで細胞内への侵入し、自己防衛や自己増殖を行なっている。本研究課題では、感染細胞内の核動態に着目し研究を行なった。我々は、核内構造体であるPML bodyがクラミジア感染宿主細胞内で変化することを見出した。しかし、PML body欠損細胞において、クラミジア感染および増殖に変化はなかった。また、様々な観点から核の構造変化とクラミジア感染について検討していく中で、核の構造変化とは関係のないAtg9Aがクラミジア増殖に影響を与えることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、結果的に、Atg9Aがオートファジー非依存的にクラミジア増殖にとって有利に働くことを明らかにした。近年、治療薬として使用されている抗生物質に耐性のクラミジアの出現が報告され始め、世界保健機構(WHO)は抗菌剤耐性に対するクラミジア感染症治療の新しいガイドラインを公表するなど警戒している。更なるクラミジア感染におけるAtg9A機能の解析は、クラミジアの新たな感染メカニズムの解明、ひいては新たな治療薬ターゲットを見出すことに繋がる。従って、このような今後の糸口を見出した本研究は、意義が高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chlamydia, which causes sexually transmitted diseases, invades into and proliferates in a host cell by manipulating the function of the cell. In this project, we focused on the nuclear dynamics in infected cells. We found that the size of the PML body, which is one of nuclear structures, were increased in Chlamydia infected cells. However, there was no change in Chlamydia infection and proliferation in PML body-deficient cells. In addition, while examining from various viewpoints, it was found that Atg9A, which is an essential factor for autophagy induction, affects Chlamydia growth, although it was not related to the structural change of the nucleus in an infected cell.

研究分野：細胞生物学

キーワード：クラミジア感染

1. 研究開始当初の背景

性感染症の一つである性器クラミジア感染症は、*Chlamydia trachomatis*(以下クラミジア)が引き起こす疾患である。女性においては、しばしば無症状で、子宮体頸管炎、子宮内膜炎、不妊および骨盤内炎症などの疾患を誘発することが知られている。治療薬としては、マクロライド系およびニューキノロン系の抗生物質が使用されるが、近年、これらの抗生物質に耐性のクラミジアの出現が報告され始めている。従ってクラミジアの感染メカニズムを解明し、新たな治療薬ターゲットを見出すことは、重要な課題のひとつである。

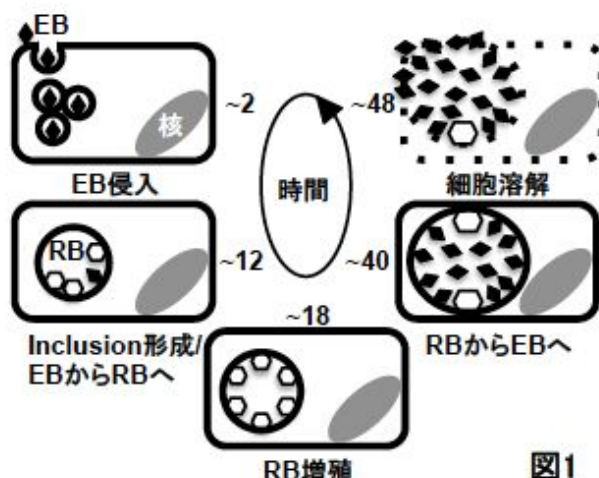


図1

偏性寄生性細菌であるクラミジアは、宿主細胞の ATP や脂質などの栄養素を利用して増殖する。また、他の微生物には見られない二相性の特徴的な増殖環を呈する。クラミジアは基本小体(EB: elementary body)として宿主細胞に取り込まれ、様々なクラミジアタンパク質を宿主細胞の細胞内へ分泌することで、lysosome との融合を防ぎ、増殖するための封入体(Inclusion)を宿主細胞内に形成する。封入体内にて、EB は感染能力の無い網様体(RB: reticular body)に姿を変えて分裂・増殖し、再び感染力のある EB に変換される。その後、増殖した EB は、宿主細胞を溶解することで新たな細胞へと感染する(図 1)。この時系列変化において、クラミジアは自身が持つ II 型や III 型などの分泌装置を介して、増殖に有利になるように様々な因子を分泌し、巧妙に宿主細胞を制御している。例えば、クラミジアの分泌タンパク質である Lda3 は、宿主細胞の脂肪滴に局在し、クラミジア増殖のための脂質供給をになっていることや、CT229 は封入体に局在し、宿主細胞内の Rab タンパク質を制御することで、封入体内に MVB (Multivesicular Body) をリクルートし、増殖を有利に働かせる。このように、宿主細胞のオルガネラに直接作用して、制御するメカニズムも知られている。

2. 研究の目的

クラミジア感染において、宿主細胞の核の形態が変化することは知られているが、その意義やメカニズムは、未だ明らかにされていない。また、宿主細胞の核内にクラミジアから分泌されたタンパク質 NUE がヒストンのメチル化に関与するという報告があるが、核内にはヘテロクロマチン領域だけでなく、PML ボディーなど様々な構造体が遺伝子発現を制御するために存在している。そこで、本研究では、クラミジア感染宿主細胞の核内構造及び核変化による感染・増殖の意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) クラミジア感染における核内構造変化について

核内構造体として、PML を用いた PML ボディー、Coilin を用いた Cajal ボディー、UBF1 を用いた Nucleolus、sc35 を用いた核スペckル、NONO を用いたパラスペckル、Bmi1 を用いた Polycomb ボディーを、Lamin A 及び Lamin B を用いた核膜構造を対象とした。最初に、構造体形成に関わるタンパク質の N 末端側に GFP を融合させたものを安定的に発現する HeLa 細胞株および A543 細胞株を、レンチウイルスベクターを使用することで作成した。

1,500G、10、30 分の遠心により、MOI10 でクラミジア (*C. trachomatis* L2/434/Bu) を各々の細胞株に感染させ、初期(4 時間後)、中期(12 時間後)、後期(24 及び 40 時間後)に 4%PFA/0.1M PB で固定し、コンフォーカル顕微鏡にて、核内構造体変化を観察

した。この際、構造体の形、大きさ、数および核内における位置を指標とした。

での観測は、核内構造体を形成するタンパク質の過剰発現株で行ったものである。そこで、変化した構造体に関しては、過剰発現を行っていない親株を用いて、免疫蛍光染色による検討を行なった。

クラミジア感染により変化のあった構造の主体をなすタンパク質のノックアウト (KO) 細胞を CRISPR/Cas9 システムを用いることで作成し、KO 細胞に対するクラミジアの力価を計測することでクラミジア感染効率を、また infectious progeny assay により KO 細胞での増殖効率を検討した。

(2) クラミジア感染におけるマクロオートファジー機構を介した核構造変化について

マクロオートファジーが誘導されない FIP200KO HeLa 細胞、Atg3KO HeLa 細胞、Atg5KO HeLa 細胞及び Atg9AKO HeLa 細胞に、クラミジアを感染させることで、Hoechst 染色で核の形態変化への影響を観察した。また、宿主細胞内でのクラミジア増殖の場である inclusion の大きさはクラミジア増殖率とおおよそ相関することが報告されている。従って、クラミジアタンパク質 MOMP 抗体での免疫蛍光染色による inclusion の大きさの測定を感染後 24 時間と 40 時間で、及び infectious progeny assay を感染後 30 時間で行うことでクラミジア増殖への影響を検討した。

変化があったものに対しては、レンチウイルスベクターでノックアウトされた遺伝子を戻し、と同様な手法でクラミジア増殖などへの影響を検討した。

4. 研究成果

(1) - 、 、

得られた細胞において、各々の核内構造体が GFP の蛍光として確認できた。そこで、MOI 10 でクラミジア (*C. trachomatis* L2) を感染させ、感染後の各々の時間で核内構造体について検討したところ、GFP-PML による PML body の大きさが感染後 24 時間以降に増大することを見出した (図 2)。PML はスプライシングにより I ~ VI まで存在するが、唯一、PML

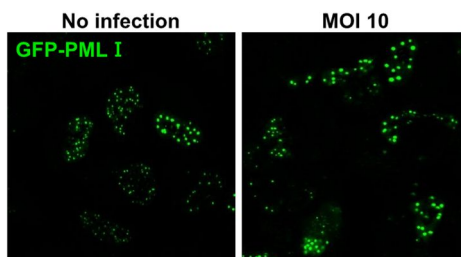


図 2

でのみ、PML body の変化が観察された。そこで、HeLa 細胞に MOI 10 でクラミジアを感染させ、内因性の PMLs による PML body の変化を、PML 抗体を用いて検討した結果、細胞あたりの PML 数に大きな変化はなかったが、PML body のサイズが約 2 倍に増大した。この結果は、最初のスクリーニングで用いた、過剰発現系による結果と一致した (図 3)。

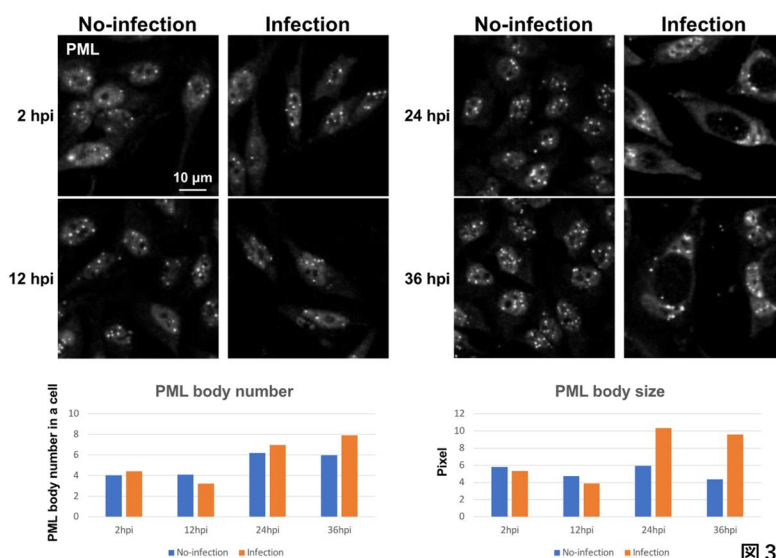


図 3

(1) -

CRISPR/Cas9 システムにより U2OS 細胞で PML をノックアウトした細胞に、クラミジア感染させ、その力価を測定することで、感染効率を検討したが、コントロール細胞と比較し、変化はなかった。更に、MOI 0.5 でクラミジアを感染させて infectious progeny assay を行うことで、クラミジア増殖への影響も検討したが、両細胞間で違いはなかった。以上の結果から、クラミジア感染時における PML body は、クラミジア感染および増殖に影響を与える核内構造物ではないことが判明した。つまり、本研究課題において、クラミジア感染および増殖に影響を与える核内構造を明らかにすることはできなかった。

(2)クラミジア感染細胞では、オートファジーが誘導されることが既に報告されている。オートファジーは、宿主細胞における細菌感染のための防御機構(ゼノファジー)としてだけでなく、様々な細胞内小器官を選択的に分解させることでクラミジア感染・増殖に有利に働いている可能性がある。酵母においては、ER ファジーやヌクレオファジーと呼ばれる小胞体や核を選択的に分解する仕組みが報告されている。そこで、選択的オートファジーのシステムを用いて核の構造変化を誘導し、クラミジア感染・増殖に影響を与えるとの仮説を立てた。

オートファジーの隔離膜形成不全細胞である FIP200 KO 細胞、Atg3 KO 細胞、Atg5 KO 細胞および Atg9A KO 細胞にクラミジアを感染させ、核の形態変化を観察したが大きな変化は見られなかったが、inclusion の大きさが、FIP200 KO および Atg5 KO では大きくなったのに対し、Atg3 KO および Atg9A KO では小さくなった。また、infectious progeny assay により、Atg9A KO においてクラミジアの増殖がおよそ 60%抑制されることが判明した(図 4 左)。

Atg9A KO 細胞においてクラミジア増殖が抑制されたのが、Atg9A の欠損によるものなのかを検討するために、レンチウイルスで Atg9A を発現させ、クラミジア増殖への影響を検討したところ、欠損状態と比較し、増殖はおよそ 2 倍に促進した。従って、Atg9A が直接、クラミジア増殖に影響していることが確認された(図 4 右)。

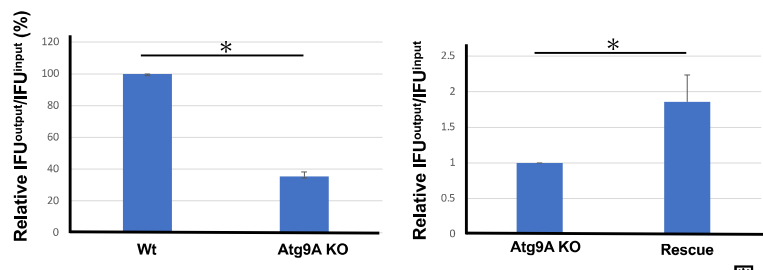


図 4

ゼノファジーが働かないのであれば、クラミジアの増殖は促進するはずである。しかし、Atg9A KO では逆に、クラミジア増殖が抑制された。つまり、本研究課題を通じて、Atg9A がオートファジー非依存的にクラミジア増殖を制御していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木倫毅
2. 発表標題 オートファジー関連分子群によるクラミジア感染制御
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木倫毅
2. 発表標題 クラミジア感染細胞におけるAtg9A機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------