

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06649

研究課題名(和文) 宿主細胞セラミドからクラミジアスフィンゴミエリンに至るフローの明瞭化と機能解析

研究課題名(英文) Elucidation and functional analysis of the flow from host cell ceramide to Chlamydial sphingomyelin.

研究代表者

熊谷 圭悟 (Kumagai, Keigo)

国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官

研究者番号：40443105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大別して二つの成果が得られた。一つ目は、セラミド輸送タンパク質(CERT)を欠損した細胞にクラミジア・トラコマティス(以下、クラミジアと略す)が感染すると、封入体膜の崩壊が発生し、クラミジアの増殖が抑制されることを解明したことである。二つ目はクラミジア感染依存的に出現する新規スフィンゴミエリン合成活性(cidSM合成活性)が、セラミド模倣型化合物である(1R,3R)-HPA-12によって特異的に抑制される事実を発見したことである。この発見により、cidSM合成活性がクラミジアの増殖に必須であり、菌体によるセラミドの取り込みにも関与していること等を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのクラミジア研究者が、クラミジアは宿主細胞のスフィンゴミエリン合成酵素(SMS)を利用すると考える中で、我々は宿主細胞のSMSがクラミジアの増殖に必要ないこと、及びクラミジア感染によってcidSM合成活性が出現することを報告した。また、(1R,3R)-HPA-12は宿主細胞のSMSを阻害せず、cidSM合成活性のみを選択的に阻害することを示し、二つの酵素の性質が異なることを示した。この化合物はcidSM合成活性に対する世界初の解析ツールであり、我々が行ったようにcidSM合成活性の機能解析に役立つだけでなく、今後は抗クラミジア薬のシード化合物として利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Two major results were obtained in this research project. First, when cells deficient in ceramide transport protein (CERT) were infected with Chlamydia trachomatis (hereafter referred to as "Chlamydia"), the inclusion membrane was disrupted, which caused suppression of Chlamydial growth. Second, we found that (1R,3R)-HPA-12, a ceramide-mimetic compound, specifically inhibits the chlamydial infection-dependent SM synthesis (cidSM synthesis) activity that appears upon chlamydial infection. By using the compound, we revealed that cidSM synthesis activity is necessary for Chlamydial growth and is also involved in ceramide uptake by the bacteria.

研究分野：生化学

キーワード：クラミジア・トラコマティス セラミド スフィンゴミエリン スフィンゴミエリン合成酵素 CERT  
封入体 細胞内寄生細菌 阻害剤

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

性器クラミジア感染症は我が国において最も感染者数の多い性感染症であり、クラミジア・トラコマティス(以下、“クラミジア”と略記)はその起因菌である。クラミジアは宿主細胞の中に封入体と呼ばれる寄生胞を形成し、その内部でのみ増殖し得る。クラミジアの増殖には宿主細胞由来の様々な代謝産物が必要であるが、その中でもセラミドが必要である点は特徴的である。宿主細胞由来のセラミド輸送タンパク質(CERT)がクラミジア由来の封入体膜タンパク質 IncD によってハイジャックされることにより、セラミドが宿主細胞の小胞体膜から封入体膜に供給される。供給されたセラミドは未解明の経路を経てクラミジアの菌体に到達し、そこでスフィンゴミエリン(SM)として検出される。菌の増殖において、セラミドやSMが担っている機能は不明である。研究開始当初、多くのクラミジア研究者は、セラミドからSMへの変換反応に宿主細胞のスフィンゴミエリン合成酵素(SMS)-2が関与していると考えていた。我々はSMS-1とSMS-2を両方も欠損した細胞を作製し、予備的にクラミジア感染実験を行ったところ、予想に反してSMS欠損細胞中でもクラミジアが正常に増殖することを見出した。宿主細胞のセラミドからクラミジア菌体中のSMに至る一連の流れ、即ち、クラミジア感染に関わるセラミドフローは、既存の理解では説明できないと我々は考え、これを解明する必要があると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の主な目的は、宿主細胞のセラミドからクラミジア菌体上のSMに至るセラミドフローを解明するとともに、そのフローがクラミジアの生存戦略にどのように関わっているのかを明らかにすることにある。クラミジア感染に関わるセラミドフローはCERTによる輸送ステップを起点として始まっているため、このステップを最初の解析対象とした。予備的検討によって、CERT欠損細胞中ではクラミジアの増殖が著しく抑制されることが分かっており、そのメカニズムを解明することを目指した。また、SMS-1とSMS-2を欠損する細胞においてクラミジアが増殖し得るという結果は既存の説では理解し難い内容である。学術研究のミスリードを防ぐためにこの現象も速やかに解析されるべきであると考え、現象の背景を理解するべく研究を進めた。

### 3. 研究の方法

CERT欠損HeLa細胞にクラミジアを感染させ、一定時間後に細胞を固定・染色することにより、細胞死が誘導されやすい時間帯について調べた。また、CERT欠損HeLa細胞等の細胞質に蛍光タンパク質を発現させ、細胞死が誘導されやすい時間帯のライブイメージング撮影を実施した。SMS-1とSMS-2を欠損する細胞にクラミジアを感染させた際のSM生合成をアイソトープ標識によって確認した。計画書に記述していた、クラミジアに由来するSMS遺伝子の探索はうまくいかなかったが、(1R, 3R)-HPA-12がクラミジア感染依存的に誘導されるSM合成活性(cidSM合成活性)を阻害することを見出し、この化合物をツールとして用いることでセラミドフローの解析を進めることが可能となった。具体的には、当該化合物を含むいくつかの阻害剤とともに、抗クラミジア活性の測定、蛍光性セラミドの局在解析、cidSM合成活性の測定、電顕解析などを実施することで解析をおこなった。

### 4. 研究成果

CERT欠損HeLa細胞にクラミジアを感染させると、感染後16時間から24時間の間に細胞死が誘導されること、封入体膜が突然崩壊し、その後速やかに宿主細胞の細胞死が誘導されることが明らかとなった。CERT欠損細胞内でクラミジアの増殖が著しく抑制されるのは、封入体膜の崩壊によって細胞死が誘導されることが原因であり、封入体膜が維持されたまま細胞死が誘導されるという可能性は否定された。封入体膜の脂質組成の変化が封入体膜の崩壊を引き起こすか否かについては明らかにすることができなかった。

SMS-1とSMS-2を欠損した細胞ではSMの生合成が検出できなかったが、この細胞にクラミジアを感染させるとSMの生合成が回復した。クラミジア感染依存的に誘導されたSM合成活性(cidSM合成活性)の働きにより、クラミジアはSMS欠損細胞中でも生存できると考えられた(DOI: 10.1002/1873-3468.13632)。cidSM合成活性を担う遺伝子は同定できなかったが、全く異なるアプローチからcidSM合成活性の機能解析等を推進した。CERT阻害剤による抗クラミジア活性を調べた際に、CERT阻害剤としてよく知られた化合物(1R, 3S)-HPA-12の立体異性体に強い抗クラミジア活性があることを発見した。この異性体(1R, 3R)-HPA-12はCERT阻害活性を持たないにも関わらず、CERT阻害剤である(1R, 3S)-HPA-12やE16Aよりも強くクラミジアの増殖を抑制

した。(図1)。立体配置が一箇所だけ異なる(1*S*,3*R*)-HPA-12は増殖抑制効果を全く示さなかったことから、この抗クラミジア活性は非特異的な化学的毒性によるものではなく、立体構造識別能を有する特定の分子の阻害により生じていると考えられた。(1*R*,3*R*)-HPA-12はセラミド模倣型の化合物であるため、この化合物がクラミジア感染に関わるセラミドフローに影響を与えている可能性が考えられた。NBD-セラミドを用いてセラミドの動態を調べたところ、(1*R*,3*R*)-HPA-12が封入体内(不均一な染色パターンからおそらく菌体そのもの)へのNBD-セラミドの局在化を顕著に抑制していた(図2)。CERT阻害剤のE16Aは、膜間移動が可能な分子であるNBD-セラミドの局在に全く影響を及ぼさなかった(図2)。この結果は、閉じた膜構造の内側に、NBD-セラミドに極性基を付加する酵素が存在することを示唆しており、(1*R*,3*R*)-HPA-12が*cidSM*合成活性を担う酵素を阻害している可能性が疑われた。In vitroのアッセイ系を用いて当該酵素への影響について検討したところ、HPA-12の4種類の立体異性体の中で(1*R*,3*R*)-HPA-12が最も強く*cidSM*合成活性を阻害した(図3)。*cidSM*合成活性に対する各立体異性体の阻害の強さが抗クラミジア活性と相関していたことから、(1*R*,3*R*)-HPA-12は*cidSM*合成活性を阻害することによって強い抗クラミジア活性を示すものと考えられた(DOI: 10.3390/ijms232314697)。

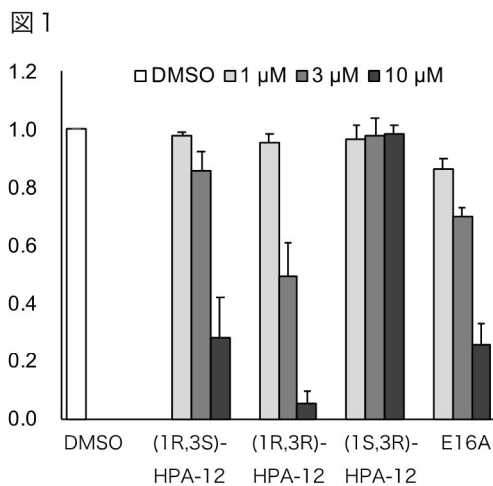


図1: 各化合物のクラミジア増殖抑制能  
各濃度の化合物を含む培地中でクラミジアをHeLa細胞に感染させ、30時間後に固定・染色した。封入体の数をDMSO処理群に対する相対値として表示した。

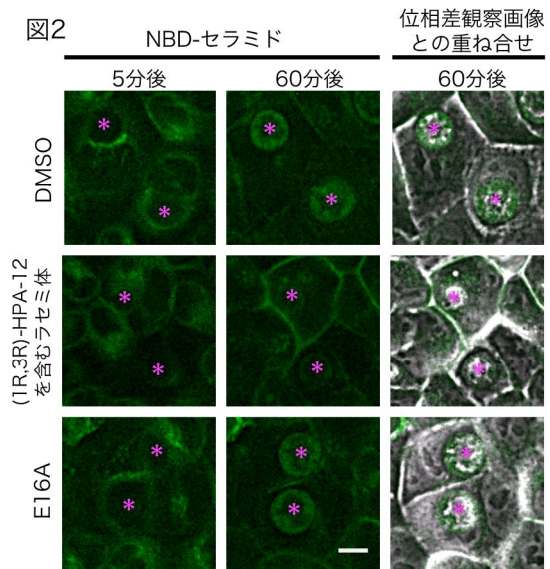


図2: NBD-セラミドを用いたセラミドの局在解析  
HeLa細胞を10 μMの化合物を含む培地で処理した後、NBD-ceramideで標識した。標識から5分後と60分後に同一視野の画像を取得し、NBD-セラミドの局在の変化を観察した。\*は封入体。

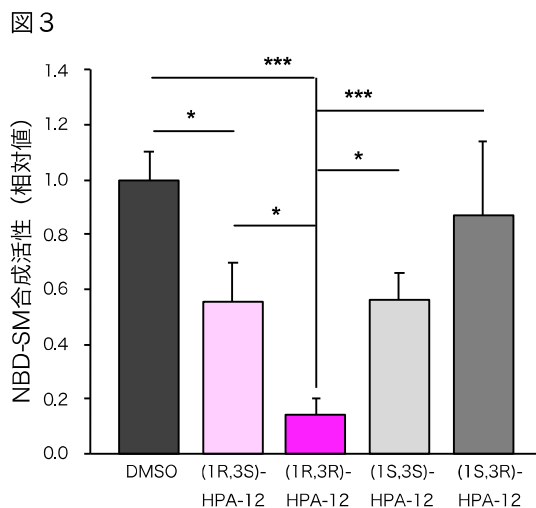


図3: クラミジア感染依存的なSM合成活性の測定  
クラミジアに感染させたSMS欠損細胞からライゼートを調製し、これを酵素源とした。HPA-12の各立体異性体を10 μM添加し、NBD-セラミドからNBD-SMへの変換活性をin vitroにて測定した。(\* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Naoki Nakao, Masaharu Ueno, Shota Sakai, Daichi Egawa, Hiroyuki Hanzawa, Shohei Kawasaki, Keigo Kumagai, Makoto Suzuki, Shu Kobayashi, Kentato Hanada	4. 巻 -
2. 論文標題 Natural ligand-nonmimetic inhibitors of the lipid-transfer protein CERT	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42004-019-0118-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Keigo Kumagai, Shota Sakai, Masaharu Ueno, Michiyo Kataoka, Shu Kobayashi and Kentaro Hanada	4. 巻 23
2. 論文標題 Chlamydial Infection-Dependent Synthesis of Sphingomyelin as a Novel Anti-Chlamydial Target of Ceramide Mimetic Compounds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 14697
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232314697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kentaro Shimasaki, Keigo Kumagai, Shota Sakai, Toshiyuki Yamaji, Kentaro Hanada	4. 巻 23
2. 論文標題 Hyperosmotic Stress Induces Phosphorylation of CERT and Enhances Its Tethering throughout the Endoplasmic Reticulum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4025
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23074025.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kentaro Hanada, Shota Sakai, Keigo Kumagai	4. 巻 23
2. 論文標題 Natural Ligand-Mimetic and Nonmimetic Inhibitors of the Ceramide Transport Protein CERT	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23042098.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Keigo Kumagai, Kentaro Hanada	4. 巻 593
2. 論文標題 Structure, functions and regulation of CERT, a lipid transfer protein for the delivery of ceramide at the ER?Golgi membrane contact sites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2366 ~ 2377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13511	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuriko Tachida, Keigo Kumagai, Shota Sakai, Shuji Ando, Toshiyuki Yamaji, Kentaro Hanada	4. 巻 594
2. 論文標題 Chlamydia trachomatis infected human cells convert ceramide to sphingomyelin without sphingomyelin synthases 1 and 2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 519 ~ 529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Keigo Kumagai, Cherilyn A Elwell, Shuji Ando, Joanne N Engel, Kentaro Hanada	4. 巻 505
2. 論文標題 Both the N- and C- terminal regions of the Chlamydial inclusion protein D (IncD) are required for interaction with the pleckstrin homology domain of the ceramide transport protein CERT	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1070 ~ 1076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.09.168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Toshihiko Sugiki, Daichi Egawa, Keigo Kumagai, Chojiro Kojima, Toshimichi Fujiwara, Koh Takeuchi, Ichio Shimada, Kentaro Hanada, Hideo Takahashi	4. 巻 293
2. 論文標題 Phosphoinositide binding by the PH domain in ceramide transfer protein (CERT) is inhibited by hyperphosphorylation of an adjacent serine-repeat motif	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11206 ~ 11217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 熊谷圭悟、杉木俊彦、児嶋長次郎、花田賢太郎
2. 発表標題 宿主細胞からクラミジア・トラコマティスへのセラミドフローを担う分子機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊谷圭悟
2. 発表標題 偏性細胞内寄生細菌クラミジア・トラコマティスによる宿主セラミドの獲得機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊谷圭悟
2. 発表標題 CERT阻害剤HPA-12の立体異性体が示す抗クラミジア活性とその作用機序
3. 学会等名 第13回セラミド研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keigo Kumagai, Yuriko Tachida, Shota Sakai, Toshiyuki Yamaji, Kentaro Hanada
2. 発表標題 Chlamydia trachomatis requires host ceramide-transport protein CERT but not sphingomyelin synthases for the infection and proliferation in HeLa cells.
3. 学会等名 60th ICBL (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshihiko Sugiki, Keigo Kumagai, Shoko Shinya, Naohiro Kobayashi, Daichi Egawa, Toshimichi Fujiwara, Kentaro Hanada, Chojiro Kojima
2. 発表標題 Structural basis for the specific association between the Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein IncD and the PH domain of the ceramide transport protein CERT.
3. 学会等名 60th ICBL (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 花田賢太郎、熊谷圭悟、杉木俊彦、新家粧子、小林直宏、江川大地、藤原敏道、児嶋長次郎
2. 発表標題 セラミド輸送タンパク質CERTと細胞内寄生細菌クラミジア封入体膜タンパク質IncDとの会合機序
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷圭悟、花田賢太郎
2. 発表標題 クラミジアのエフェクタータンパク質IncDと宿主細胞由来のセラミド輸送タンパク質CERTのPHドメインとの結合にはIncDのN末領域とC末領域が必要である
3. 学会等名 第3回オルガネラゾーン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉木俊彦、熊谷圭悟、新家粧子、小林直宏、藤原敏道、花田賢太郎、児嶋長次郎
2. 発表標題 クラミジア封入体膜蛋白質IncDが脂質輸送蛋白質CERTに選択的に結合する分子機構の溶液NMR解析
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷圭悟、立田由里子、酒井祥太、山地俊之、花田賢太郎
2. 発表標題 宿主細胞のスフィンゴミエリン合成酵素は Chlamydia trachomatis の細胞内寄生に必須ではない
3. 学会等名 第36回クラミジア研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keigo Kumagai, Yuriko Tachida, Shota Sakai, Toshiyuki Yamaji, Kentaro Hanada
2. 発表標題 Chlamydia trachomatis requires host ceramide-transport protein CERT but not sphingomyelin synthases for the infection and proliferation in HeLa cells
3. 学会等名 9th CBRS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島崎健太郎、熊谷圭悟、酒井祥太、山地俊之、花田賢太郎
2. 発表標題 高浸透圧ストレスにより誘導されるリン酸化を介したセラミド輸送タンパク質CERTの小胞体への局在化亢進に関する解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 熊谷 圭悟	4. 発行年 2019年
2. 出版社 食品化学新聞社	5. 総ページ数 10
3. 書名 セラミド研究の新展開	

〔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
研究協力者	島崎 健太郎  (Shimasaki Kentaro)	国立感染症研究所・細胞化学部	

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