

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670065

研究課題名(和文) クラミジア菌による宿主細胞脂質輸送ハイジャックを阻止する分子戦略研究

研究課題名(英文) Molecular strategy for the prevention of Chlamydia hijacking of a host lipid transport system

研究代表者

花田 賢太郎 (HANADA, KENTARO)

国立感染症研究所・細胞化学部・部長

研究者番号：30192701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：偏性細胞内寄生クラミジア菌の増殖には宿主のセラミド輸送タンパク質CERTが関わっており、CERTのプレクストリン相同(PH)ドメインと寄生胞膜タンパク質IncDとの間には物理的会合がある。CERTのゴルジ体へのセラミド輸送機能には、PHドメインのホスファチジルイノシトール 4-モノリン酸(PI4P)結合活性が必要であるが、当該結合活性を失った変異PHドメインでもIncDとの結合は維持されることを見出し、CERTのPHドメインはそのPI4P結合ポケットとは異なる部分でIncDと会合すると示唆した。本成果により、当該PHドメインとIncDとの会合を選択的に阻害する分子戦略が提示できるようになった。

研究成果の概要(英文)：The obligate intracellular bacterium Chlamydia requires the ceramide transport protein CERT of host cells for infection, and the pleckstrin homology (PH) domain of CERT associates with the inclusion membrane protein IncD. The PH domain of CERT has a phosphatidylinositol 4-monophosphate (PI4P) binding activity to transport ceramide to the Golgi apparatus. We here showed that mutant PH domains defective in PI4P-binding are still capable of associating with IncD, suggesting an interaction of the PH domain with IncD at the region different from its PI4P-binding pocket. This study presents a molecular strategy for the prevention of Chlamydia hijacking of host cell CERT.

研究分野：遺伝生化学

キーワード：脂質 輸送 クラミジア セラミド プレクストリン相同ドメイン ホスホイノシチド 感染症

1. 研究開始当初の背景

感染症は現代でも全世界的な重大問題であり、薬剤耐性の頻発には特に悩まされている。抗感染症医薬のターゲットを宿主側の分子にすることができれば、当該ターゲットの遺伝子変異による薬剤耐性の出現はほぼ抑えられるのではないかと期待されているが、宿主因子をターゲットとする場合、宿主のために発揮している機能を損う副作用が危惧される。よって、このような方向性の抗感染症医薬の開発には、宿主細胞への影響を極力避けて病原体因子との相互作用を選択的に断ち切るような分子レベルでの戦略が重要になってくる。

生体膜を構成する主要構成因子である脂質の細胞内選別輸送の分子機構は、タンパク質のそれに比べて解明が遅々としている。しかし、小胞体からゴルジ体へと脂質セラミドを選別輸送する分子装置 CERT を我々が発見したことを契機として (Hanada et al 2003 *Nature*) 脂質トラフィックについても分子レベルでの解析が成されるようになってきた。我々は、CERT がゴルジ体への会合に重要な PH ドメイン、小胞体の会合に関与する領域、そして膜間セラミド転移を触媒する START ドメインから形成されていることを明らかにし、CERT を介したセラミド輸送は小胞体とゴルジ体が近接した領域における脂質分子の引き抜き・転移メカニズムで起こるというモデルを提唱している (Hanada 2006 *Mol Cell Biochem*; Hanada 2014 *BBA*)。

偏性細胞内寄生細菌クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) は日本を含む多くの先進国において性感染症の最大起因病原体である。クラミジア菌の寄生増殖に宿主細胞の CERT が関与することが CERT の阻害剤や siRNA 実験により示されており、さらに、CERT の PH ドメインとクラミジア菌寄生胞 (封入体) 膜タンパク質 IncD との間には物理的相互作用があることも示唆されている (Elwell et al 2011 *PLoS Pathog*; Derre et al 2011 *PLoS Pathog*)。一方、我々は CERT PH ドメインの三次構造を NMR によって解き明かし、当該ドメインのホスファチジルイノシトール 4-モノリン酸 (PI4P) 結合ポケットを明確にした上で、PI4P 結合活性に必要なアミノ酸残基も同定している (Sugiki et al 2012 *JBC*)。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究課題では、CERT がゴルジ体と寄生胞それぞれを認識す

る機序の差を明らかにし、クラミジア菌による CERT のハイジャックを選択阻害する分子戦略を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CERT PH ドメインと IncD との相互作用解析

CERT PH ドメインの PI4P 結合欠損変異体に HA タグを付加したコンストラクトと全長 IncD に FLAG タグを付加したコンストラクトを HeLa 細胞に共発現させた。細胞を界面活性剤で可溶化して得られた細胞抽出液に対して Anti-FLAG 抗体で免疫沈降を行い、共沈してきた各種 CERT PH を Anti-HA 抗体によるウェスタンブロッティングで検出した。

(2) CERT 遺伝子欠失 HeLa 細胞の作出及びクラミジア菌の感染

CERT 遺伝子を標的とした人工ヌクレアーゼ TALEN (遺伝子編集法の 1 種) の発現ベクターを作製し、HeLa 細胞にトランスフェクションした。細胞をクローニングし、それぞれのクローンに関して、TALEN 標的部位付近の変異をシーケンシングにて確認した。さらに、CERT 遺伝子が欠失した際に見られる表現系であるスフィンゴミエリンの低下も確認した。また、この変異細胞に野生型 CERT の cDNA を安定導入した回復株を樹立する際には、HeLa 親株における内在性 CERT タンパク質発現レベルにほぼ等しくなるように shRNA を用いた工夫を施した。

これら HeLa 細胞にクラミジア菌 (*C. trachomatis* L2 株) を感染させ、24 時間後に固定した。固定した試料に対して、免疫蛍光染色を施して共焦点顕微鏡で観察した。

(3) Vero 細胞のゲノム構造決定

現在手に入る最も継代数が少ない Vero 細胞 JCRB0111 株 (継代数 115) をシード細胞とした。核型解析は G バンド法及び多色 FISH 法で行った。ゲノム配列決定のために、ペアエンドー及びメイトペアのゲノム DNA ライブラリを作製し、イルミナ社 HiSeq2000 を用いてシーケンスした。ゲノムサイズの約 50 倍のショートリードデータをもとにアセンブリを作成し、エキソン・イントロン部位の予測には RNA-seq データも活用した。ショートリードやアセンブルしたゲノム配列ドラフトの配列データは公的データベースにアクセス番号 DRA002256 として登録した。

4. 研究成果

(1) CERT PH ドメインと IncD との相互作用

前述したように CERT は小胞体からゴルジ体へとセラミドを特異的に運ぶためのタンパク質であり、ゴルジ体にリクルートされるためには当該 PH ドメインの PI4P 結合活性が必要である。CERT の PH ドメインの各種変異体を用いて解析を進め、当該結合活性を失った変異 PH ドメインでも IncD との結合は維持されることを見出し、CERT の PH ドメインはその PI4P 結合ポケットとは異なる部分で IncD と会合すると示唆した。

本成果により、CERT の PH ドメインと IncD との会合を選択的に阻害する分子戦略が提示できるようになった。

(2) CERT 遺伝子欠失 HeLa 細胞の作出及びクラミジア菌の感染

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞は疑似三倍体の核型を持つ。CERT の三つの遺伝子座全てをゲノム編集技術により破壊した CERT 遺伝子欠失 HeLa 細胞を作製することに成功した。本変異株では、ウエスタンブロッティング解析でも CERT の発現が検出限界以下であった。

この CERT 欠失 HeLa 細胞とクラミジア菌を共培養しても封入体が形成されず、菌自体も増殖しなかった。しかし、この HeLa 変異細胞に野生型の CERT を発現させると封入体形成及び菌増殖が完全に回復した。これらの結果により、宿主細胞の CERT はクラミジア菌感染に必須であることが明らかとなった。

(3) Vero 細胞のゲノム構造決定

Vero 細胞はアフリカモドリザル (AGM) 腎臓から 1962 年に我が国で樹立された継代培養細胞株である。微生物学研究の実験材料としてだけでなく、ワクチン生産細胞としても汎用されている Vero 細胞の全ゲノム配列を世界に先駆けて解読し、核型解析や RNA-seq 解析の結果も合わせてゲノム構造を統合的に明らかにした。

Vero 細胞の 2.95 Gbp のゲノムには、25,877 の遺伝子が見出された一方で、さまざまなゲノム構造異常も見つかった。例えば、12 番染色体には 9 Mbp のホモ接合欠失がその周囲 59 Mb のヘテロ接合性消失 (loss of heterozygosity) とともに見出され、この欠失のために I 型インターフェロン遺伝子クラスターやサイクリン依存性キナーゼインヒビター遺伝子 *CDKN2A/2B* が失われていた。

また、AGM には複数の種があるが、Vero 細胞はメスの *Chlorocebus sabaues* に由来することや、ゲノムに内在するサル・D 型レトロウイルスの配列多様性も明らかとなった。これらの情報は、新しい Vero 細胞亜株をゲノム

編集技術で作製することや、細胞の品質管理をゲノムレベルで行う新手法の開発に役立つ基盤資源となる。

なお、上で述べた Vero 細胞に関する研究は、報告者らの研究グループと国立遺伝研、医薬基盤研、感染研・病原体ゲノム解析研究センターの研究グループとの共同研究で実施したものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

英文論文(全て査読有)

1) Kentaro Hanada: Co-evolution of sphingomyelin and the ceramide transport protein CERT, *Biochim. Biophys. Acta*, 1841, 704-719, 2014. doi: 10.1016/j.bbali.2013.06.006

2) Toshiyuki Yamaji and Kentaro Hanada: Establishment of HeLa cell mutants deficient in sphingolipid-related genes by using TALENs, *PLoS ONE*, 9, e88124, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0088124

3) Keigo Kumagai, Miyuki Kawano-Kawada, and Kentaro Hanada: Phosphoregulation of CERT at serine 315 in the interaction with VAMP-associated protein (VAP) for inter-organelle trafficking of ceramide in mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, 289, 10748-10760, 2014. doi: 10.1074/jbc.M113.528380

4) Kentaro Hanada and Dennis Voelker: Interorganelle trafficking of lipids: preface for the thematic review series, *Traffic*, 15, 889-894, 2014. doi:10.1111_tra.12193

5) Naoki Osada, Arihiro Kohara, Toshiyuki Yamaji, Noriko Hirayama, Fumio Kasai, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, and Kentaro Hanada: The genome landscape of the African green monkey kidney-derived Vero cell line, *DNA Res.*, 21, 673-683, 2014. doi: 10.1093/dnares/dsu029

6) Toshiyuki Yamaji and Kentaro Hanada: Sphingolipid metabolism and interorganellar transport: localization of sphingolipid enzymes and lipid transfer proteins, *Traffic*, 16, 101-122, 2015. doi: 10.1111/tra.12239

和文論文(査読なし)

7) 熊谷圭悟、花田賢太郎: 効率的な細胞内セラミド輸送の仕組みとその制御、*医学の歩み*, 248, 1125-1131, 2014.

〔学会発表〕(計 15 件)

国際学会(招待講演)

1) Kentaro Hanada: Structural biology revealed the serendipity of development of HPA-12, a potent inhibitor of intracellular trafficking of ceramide, FASEB Science Research Conference: Lysophospholipid and other Related Mediators - From Bench to Clinic, August 4-9, 2013, Niseko, Japan

2) Kentaro Hanada: Introductory remarks for the session of Membrane Dynamics and Trafficking, Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, January, 12-17, 2014, Ventura, CA, USA

3) Kentaro Hanada: Phosphoregulation of inter-organelle traffic of ceramide in mammalian cells, The International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (KSMCB) 2014, October, 21- 23, 2014, Seoul, Korea.

国際学会(一般参加)

4) Toshiyuki Yamaji and Kentaro Hanada: TALEN-Mediated Disruption of Sphingolipid-Related Genes in a HeLa Cell Line, 54th International Conference on the Bioscience of Lipids: Linking Transcription to Physiology in Lipidomics, 17-21 September 2013, Bari, Italy

5) Toshiyuki Yamaji and Kentaro Hanada: TALEN-Mediated Disruption of Several Sphingolipid-Related Genes in a HeLa cell line, Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, January, 12-17, 2014, Ventura, CA, USA

国内学会

6) 山地俊之、花田賢太郎: 人工ヌクレアーゼを用いた種々のスフィンゴ脂質関連遺伝子の変異株作製、第55回日本脂質生化学会大会、平成25年6月6-7日、松島。

7) 山地俊之、花田賢太郎: 人工ヌクレアーゼを利用したゲノム編集技術によるスフィンゴ脂質関連遺伝子破壊 HeLa 細胞変異株パネル作成の試み、第8回スフィンゴセラピー研究会、平成25年7月12-13日、加賀。

8) 山地俊之、花田賢太郎: 人工ヌクレアーゼTALENを用いた種々のスフィンゴ脂質関連遺伝子の変異株作製、第32回日本糖質学会大会、平成25年8月5-7日、大阪

9) 花田賢太郎: 膜接触部位を介した宿主細胞セラミドのクラミジア菌寄生

胞・封入体への輸送、第86回日本生化学会大会、平成25年9月11-13日、横浜。

10) 山地俊之、花田賢太郎: 遺伝生化学的手法を用いたスフィンゴ糖脂質研究、第86回日本生化学会大会、平成25年9月11-13日、横浜。

11) 花田賢太郎: 細胞内セラミド輸送をつかさどる CERT の発見、第6回セラミド研究会学術集会、平成25年11月7-8日、札幌。

12) 花田賢太郎: セラミドの構造多様性について、スフィンゴ脂質データベースワークショップ、平成26年5月22-23日、三島。

13) 熊谷圭悟、花田賢太郎: セラミド輸送タンパク質CERTのリン酸化による機能制御、第56回日本脂質生化学会大会、平成26年6月6-7日、大阪。

14) 花田賢太郎、熊谷圭悟: CERT-VAP 間の相互作用調節を介したセラミド輸送の制御、第9回スフィンゴセラピー研究会、平成26年7月18-19日、加賀。

15) 花田賢太郎、山地俊之、黒田誠、関塚剛史、小原有弘、笠井文生、平山知子、長田直樹: アフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞のゲノム構造決定、第87回日本生化学会大会、平成26年10月15-18日、京都

〔その他〕

ホームページ等 (ページ名と URL)

(1) 花田の研究テーマなど

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-biochem/3257-2013-02-25-06-28-53.html>

(2) TALEN 技術を用いてのスフィンゴ脂質関連遺伝子の欠損した HeLa 細胞変異株の樹立
<http://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/466-biochemistry/4431-biochem-2014-1.html>

(3) CERT のセリン 315 のリン酸化は、オルガネラ間のセラミド輸送に必要とされる CERT-VAP 間の相互作用を調節する
<http://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/466-biochemistry/4576-biochem-2014-2.html>

(4) アフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞のゲノム構造決定
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticles/research/467-basic-science/genome/5300-genome-2015-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花田 賢太郎 (HANADA, Kentaro)

国立感染症研究所・細胞化学部・部長

研究者番号: 30192701

(2)研究分担者

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

山地 俊之 (YAMAJI, Toshiyuki)

国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官

研究者番号： 50332309

齊藤 恭子 (SAITO, Kyoko)

国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官

研究者番号： 70235034

(3)連携研究者

杉木 俊彦 (SUGIKI, Toshihiko)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：70635698