

るアメーバを株化し、共生する原始クラミジアのユニークな特性について細胞分子レベルでの検討を始めた。本稿では、まずクラミジアの概要を説明した上で原始クラミジアのユニークな特徴について私達の実験データをもとに紹介したい。

2. 病原性クラミジアと原始クラミジア

クラミジアの分類上の広がりには極めて広くクラミジアスーパーファミリーとも称されている(図1)¹⁾。現在クラミジア目は、*Chlamydiaceae*、*Parachlamydiaceae*、*Waddliaceae*、*Simkaniaceae*の4科に分類されている。ヒトに感染し、肺炎や性感染症の原因となる*Chlamydia pneumoniae*や*C. trachomatis*などを含む病原性クラミジアは*Chlamydiaceae*の1科に属し、後者3科が原始クラミジアである。原始クラミジアと病原性クラミジアの分岐は今から7億年以上前に遡るが、分岐後の進化の過程で適応した宿主域は大きく異なり、病原性クラミジアが哺乳動物から魚類に至るまで、脊椎動物に幅広く生息する一方、原始クラミジアの生息環境は主にアメーバなど原生動物に限られている^{1, 2)}。一方、どちらのクラミジアも他の細菌種には見られないユニークな増殖環を持ち、宿主細胞への感染能力はあるが分裂増殖能を欠いた基本小体(elementary body:EB)と感染能力はない細胞内にて分裂する網様体(reticulate body:RB)より構成されている(図2)¹⁾。原始クラミジアには更にユニークな形態学的な特徴があり、環境の劣悪化に伴い、EBから三日月体(crescent body:CB)という特異な形態が観察される場合がある(図2B、c)。病原性クラミジアの細胞への付着ならびに細胞内での生存・増殖様式は大変良く調べられている。まず病原性クラミジアの宿主細胞への付着には、菌体表層に発現している外膜蛋白OmcBやストレス蛋白質HSP70が宿主細胞上の細胞外マトリックスプロテオグリカンの側鎖ヘパリンや繊維芽細胞増殖因子2に結合することが重要である³⁻⁵⁾。その後、細胞に付着したEBのIII型分泌装置にて細胞質に打ち込まれるTARP(translocated actin recruiting phosphoprotein)によりアクチンの再重合が誘導され、それに伴い形成される細胞表層の台座を介して宿主細胞内へと取り込まれて行く^{6, 7)}。宿主細胞内に移行したEBは食胞に類似した封入体膜に包まれRB

へと変換して行くが、封入体膜上には食胞が成熟するために必要なマーカーが見られず、リソソームとの融合が起こらない^{8, 9)}。更に、感染した宿主細胞がアポトーシスに陥らない様な細胞修飾機構を保有している¹⁰⁾。その機構も良く調べられていて、菌体から分泌され細胞質に放出されるCPAF(chlamydial protease/proteasome-like activity factor)が、アポトーシス刺激の主要なセンサーであるBH3-only proteinを分解することで、感染細胞がミトコンドリアの機能不全を介してアポトーシスに陥ることを防いでいる¹¹⁾。その一方、強力な殺菌機構を備えたアメーバへの感染様式やアメーバ内での原始クラミジアの宿主細胞への修飾機構は全く明らかになっていない。

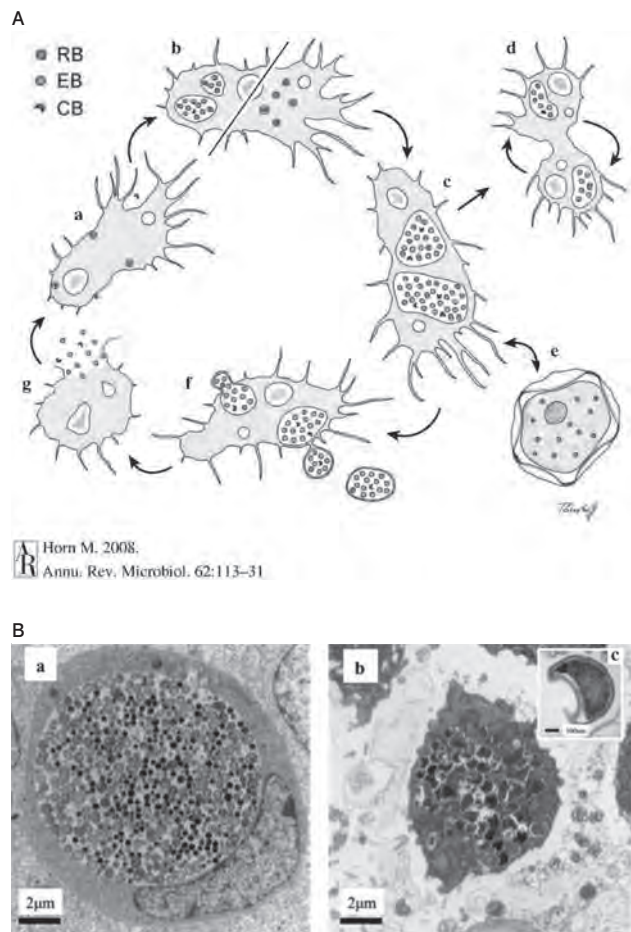


図2 原始クラミジアの増殖環と形態学的な特徴

- A. 原始クラミジアの増殖環。最終分化や死滅する過程ではないので生活環とは呼ばない。aからg:増殖環の進行方向。EB:基本小体、RB:網様体、CB:三日月体。参考文献1、Figure 3より引用
- B. 原始クラミジアの形態学的な特徴を示す透過型電子顕微鏡像。左(a):ヒト上皮細胞HEp-2細胞に感染した病原性クラミジア(*Chlamydia pneumoniae* TW183株)とその封入体。感染後72時間。右(b, c):アメーバに感染した*Parachlamydia acanthameobae*。三日月体(c)は*P. acanthaomebae*の特徴と考えられているが、電顕固定時のアーチファクトの可能性も否定できない。一部の電顕写真は、私達の発表論文(Microbiology and Immunology, 54: 63-73, 2010)より転用。

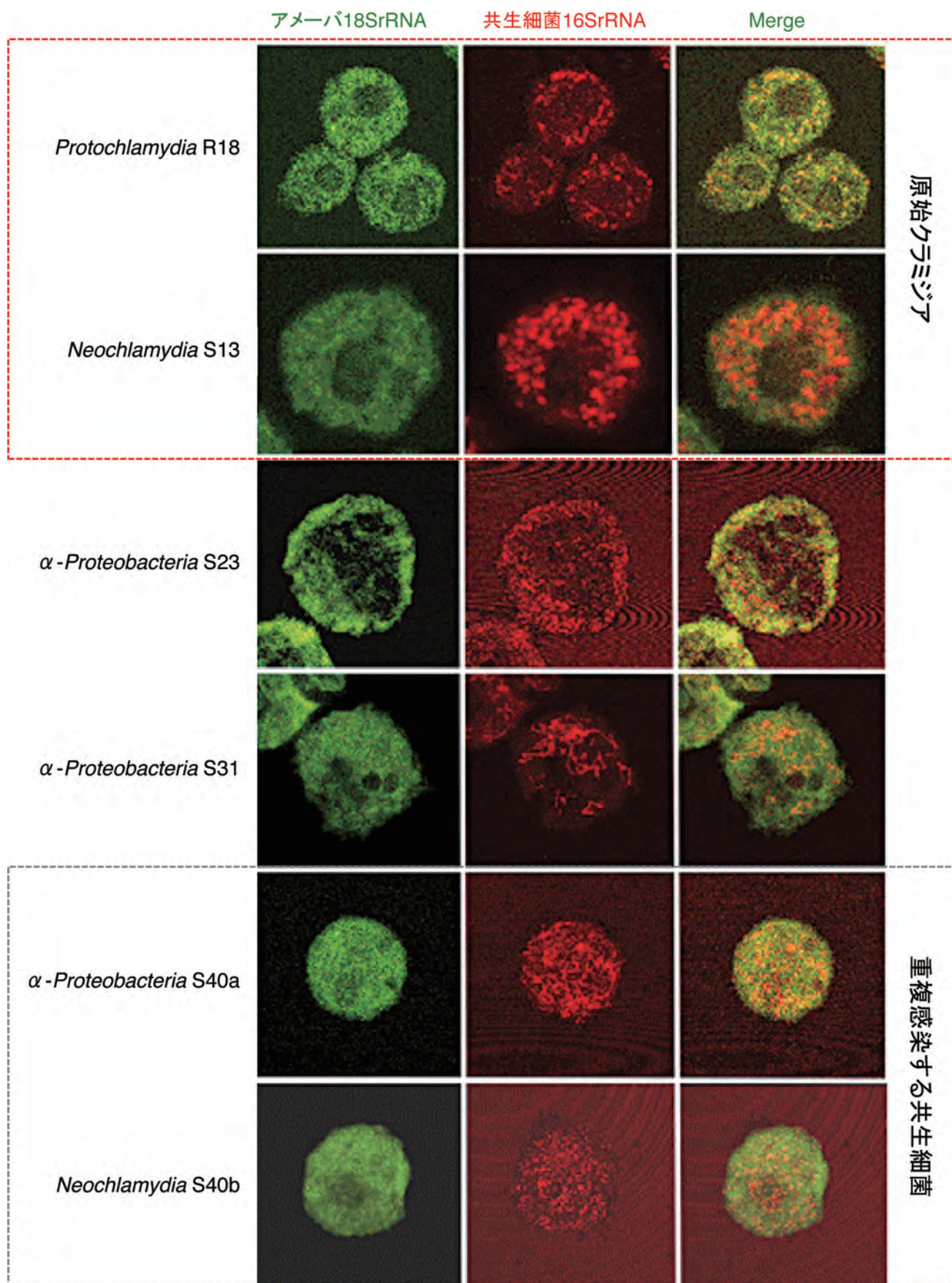


図3 FISHによる株化アメーバ内共生細菌の可視化
 アメーバを固定後、アメーバ18SrRNA(緑)とクラミジアあるいはクラミジアを除く細菌16SrRNA(赤)に特異的なプローブを用いてFISHを行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。参考文献12, Figure 2より引用、一部改変

3. 原始クラミジアが共生するアメーバの株化と共生細菌の可視化

既に述べたように原始クラミジアは、病原性クラミジアの適応進化を紐解く鍵になる有用なモデルにもかかわらず、その宿主細胞への修飾機構は明らかになっていない。そこで私達は、土壌や河川水から41株のアメーバを株化し、共生細菌の有無を調査することから始めた。その結果、偏性細胞内寄生性の細菌が共生する5株のアメーバ株の樹立に成功し系統解析の結果、そのうち3株に原始クラミジア (*Neochlamydia*と*Protochlamydia*) が共生していることをつきとめた¹²⁾。FISHによる可視化からは、いずれの共生細菌もアメーバ細胞質に広く分布していることが判明した(図3)¹²⁾。樹立したアメーバ内でのこれら原始クラミジアの共生様式は極めて興味深く、以下に紹介する。原始クラミジア *Neochlamydia* S13と*Protochlamydia* R18が共生するアメーバ株は土壌ならびに河川水よりそれぞれ分離株化された。これらアメーバに共生するどちらの原始クラミジアも、アメーバから取り出すと24時間以内に死滅した。興味深いことにアメーバより取り出された *Protochlamydia* R18は容易にアメーバへ再感染したが、*Neochlamydia* S13はアメーバに侵入できるが消化されてしまい再感染の成立は確認できなかった(図4)¹²⁾。このように他の原始クラミジア *Protochlamydia* R18に比べ *Neochlamydia* S13は進化の過程で、アメーバへの依存度が増したものと考えられる。

一方、アメーバは、栄養分が豊富にある環境では活発に分裂増殖する栄養型として存在するが、乾燥

や栄養分枯渇など生育環境の悪化に伴い耐久型シストに移行する。シストに移行した休眠状態のアメーバは分裂・増殖せず、代謝活性が極めて低い状態に維持されているので、シストは偏性細胞内寄生性の環境クラミジアにとっても極めて過酷な環境であると考えられる。そこで私達は、アメーバシスト内でも *Protochlamydia* R18の生存性や感染性が維持されているかどうか検討した。シスト移行後1ヶ月間4℃に放置したアメーバを復帰

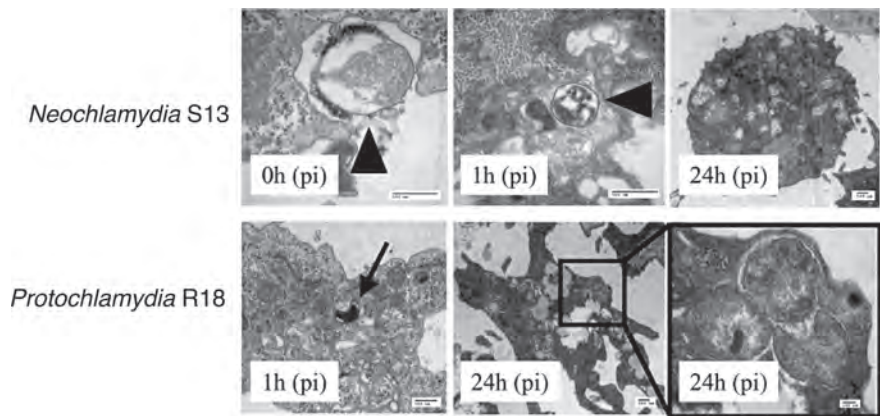


図4 原始クラミジア *Protochlamydia* R18はアメーバに再感染できるが *Neochlamydia* S13はできない。
 上段：アメーバより取り出した *Neochlamydia* S13のアメーバへの再感染後の透過型電子顕微鏡(TEM)像。アメーバに侵入するが、その後の分裂増殖は認められない。
 下段：アメーバより取り出した *Protochlamydia* R18のアメーバへの再感染後のTEM像。
 参考文献12, Figure 4より引用、一部改変

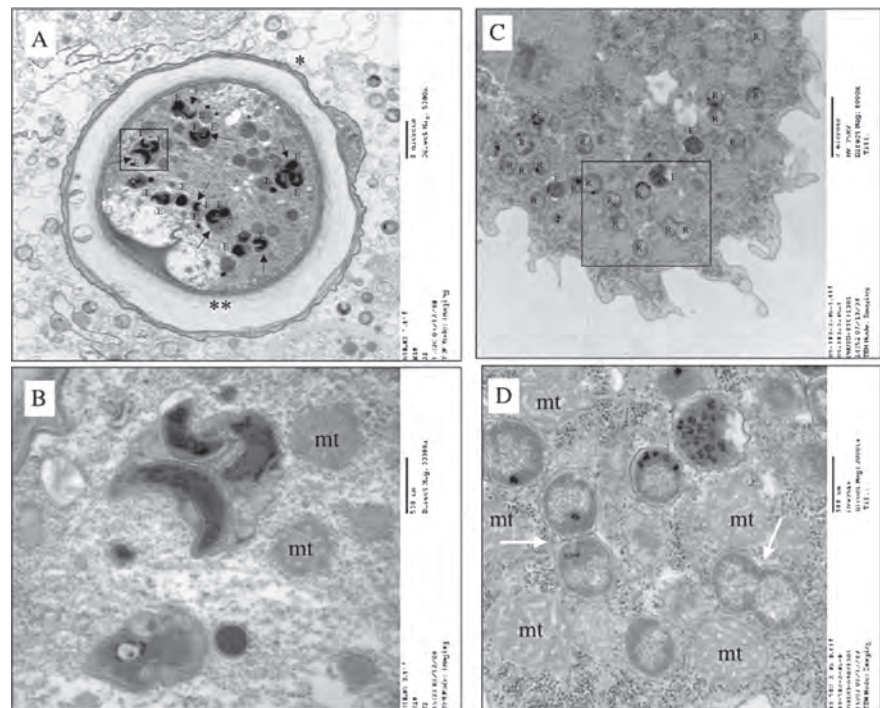


図5 TEM解析で観察されたアメーバシスト内の原始クラミジア *Protochlamydia* R18の局在と栄養型に復帰したアメーバ細胞質での分裂増殖。
 A. アメーバシスト内の *Protochlamydia* R18。E：基本小体 □は拡大(B)
 B. シスト内共生細菌の微細構造。mt：ミトコンドリア
 C. 栄養型に復帰したアメーバ内の *Protochlamydia* R18。E：基本小体 R：網様体 □は拡大(D)
 D. 栄養型に復帰したアメーバ内共生細菌の微細構造。mt：ミトコンドリア

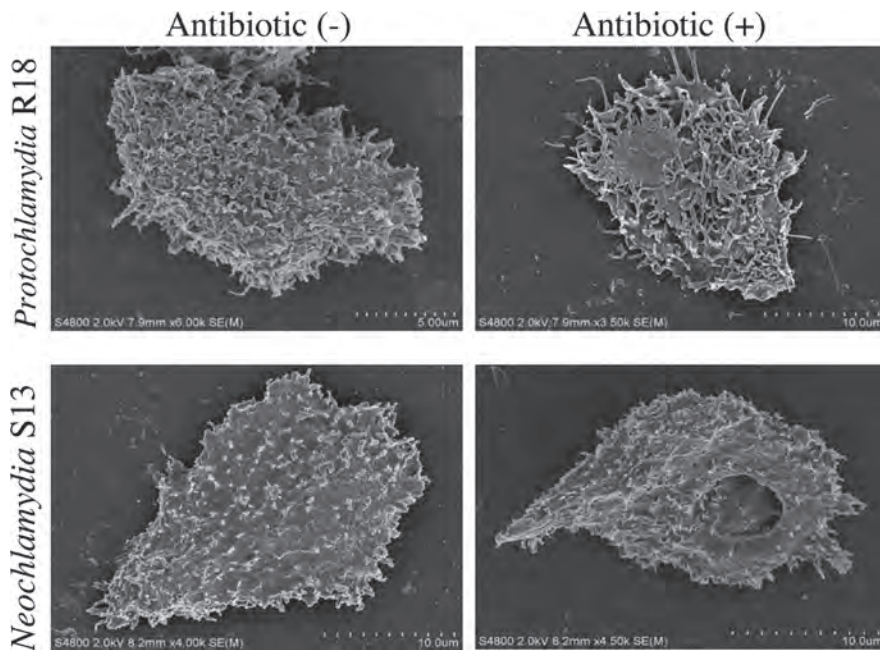


図6 *Protochlamydia* 除菌アメーバで観察された糸状仮足の異常発現。
Neochlamydia S13 除菌アメーバではこのような現象は観察されなかった。
参考文献 14、Figure 5 より引用

させ菌数算定やFISHにてアメーバ内の *Protochlamydia* R18 の動態についてモニタリングした。その結果、シストから復帰後のアメーバで菌数の増加が確認されたことより、*Protochlamydia* R18 がアメーバシスト内においても感染性を維持しながら生存できることが明らかになった(図5)¹³⁾。このように *Protochlamydia* R18 にとってアメーバシストは土壌や河川水など自然環境中で普遍的に起こりうる激しい温度や栄養分の変化から身を守るためのシェルターとして機能している可能性がある。

4. 原始クラミジア *Protochlamydia* R18 による宿主アメーバの運動能と発育スピードの制御

何故、アメーバは原始クラミジアの共生を許容したのだろうか。その理由を探るためにアメーバに共生する原始クラミジアを抗菌剤で除菌し無菌アメーバを樹立し、除菌前の親アメーバの発育スピードや運動能などの表現型について比較した。その結果、原始クラミジア

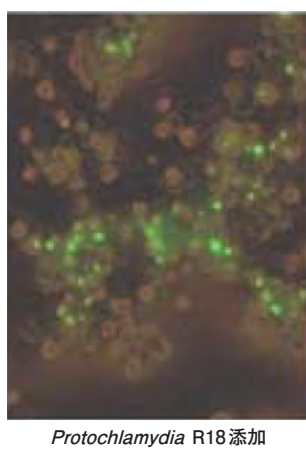
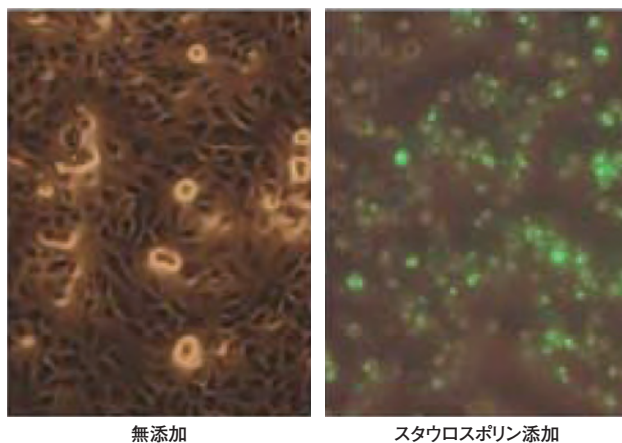


図7 *Protochlamydia* R18 刺激ヒト上皮細胞株 Hep-2 細胞はアポトーシスを誘導する。
Protochlamydia R18 を MOI 90 で Hep-2 細胞に添加し、24 時間後に、TUNEL 染色にて核酸の断片化を可視化した。緑は TUNEL 染色陽性のアポトーシス細胞。倍率：100 倍
参考文献 16、Figure 2 より引用、改変

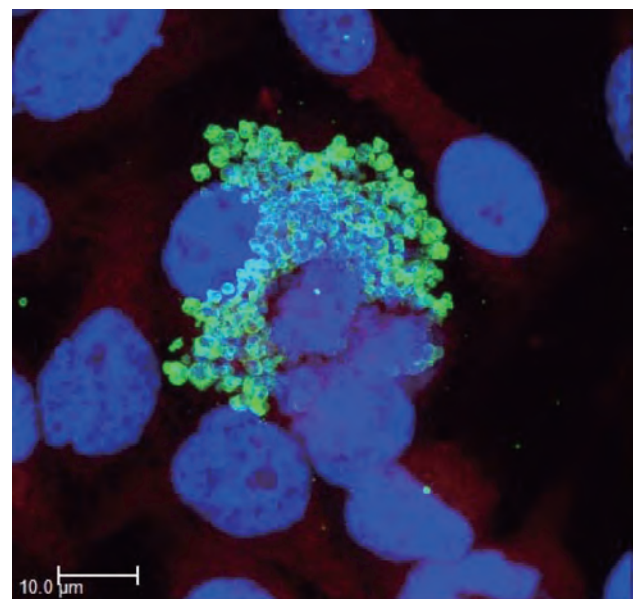


図8 低温30℃培養条件下ヒト細胞株 Hep-2 細胞内で増殖する *Parachlamydia* Bn9。
Hep-2 細胞に *Parachlamydia* Bn9 を添加し低温 (30℃) 下で3日間培養し、固定後、抗 *Parachlamydia* ポリクローナル抗体で染色した。標本は共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。緑：菌体 青：DAPI

Protochlamydia R18を除菌したアメーバでは、アメーバの増殖と運動能が顕著に低下し、再感染アメーバでは回復することを見つけた¹⁴⁾。一方、除菌はアメーバの飲作用や貪食には影響を与えなかった¹⁴⁾。興味深いことに*Protochlamydia* 除菌アメーバではアクチン重合の鈍化と異常な糸状仮足が観察され、共生細菌によるアメーバの制御は、アメーバアクチン重合系の修飾を要求する可能性が示唆された(図6)¹⁴⁾。これらの現象は*Neochlamydia* S13共生アメーバでは見いだすことができなかった。このように、アメーバと共生する原始クラミジアとの間には極めて安定したしかも特異な共生様式が存在する可能性が示唆された。*Protochlamydia* R18の共生は、アメーバが効率良く周囲の細菌を補食することを可能とし、アメーバの生存性に大きな優位性を賦与している可能性が高い。一方、*Neochlamydia* S13の除菌は、アメーバの増殖スピードを向上させた¹⁴⁾。予想に反したこの結果はどのように解釈したら良いのだろうか。私達はその理由を探るべく検討を進めている。

5. 原始クラミジア *Protochlamydia* R18によるヒト上皮系細胞株HEp-2細胞へのアポトーシス誘導

私達は、通常の培養条件下において一部の原始クラミジア(*Parachlamydia* Bn₉)が株化ヒト細胞内で増殖できないことを見つけた¹⁵⁾。何故、増殖できないのだろうか。その理由を明らかにすべく、*Protochlamydia* R18をヒト上皮細胞株HEp-2細胞に添加し細胞の修飾変化について詳細に解析することにした。その結果、驚いたことに*Protochlamydia* R18生菌刺激はHEp-2細胞にアポトーシスを誘導した(図7)¹⁶⁾。このアポトーシス誘導は、アクチン重合阻害剤サイトカラシンDやカスパーゼ3阻害剤の添加で顕著に抑制された¹⁶⁾。その一方、細胞内での*Protochlamydia* R18の増殖は確認できなかった¹⁶⁾。これらの結果は、このアポトーシス誘導には、*Protochlamydia* R18の細胞内への侵入が不可欠であるが、菌体増殖に伴う代謝活性は要求しないことを示唆している。このアポトーシスを誘導する*Protochlamydia* R18エフェクターとはどのような分子なのだろうか。私達はそのヒントを既に見つけている。プロテオソーム阻害剤ラクタシチンは病原性クラミジアから分泌されるCPAFに結合し、CPAFのプロテアーゼ

活性を阻害することで、アポトーシスからの回避を妨げるコンパウンドとして知られているが¹⁷⁾、この薬剤添加は*Protochlamydia* R18によるアポトーシス誘導も顕著に抑制した¹⁸⁾。この結果は、病原性クラミジアと原始クラミジアがそれぞれ保有するCPAFの基質特異性が、進化の過程で大きく変化した可能性を示唆するものであり極めて興味深い。

6. 原始クラミジア (*Parachlamydia* Bn₉)の低温下でのヒト株化細胞HEp-2内不完全増殖

既に述べたように原始クラミジアは、37°Cではヒト株化上皮細胞へ侵入できるが増殖できない。その一方、低温下(30°C)で*Parachlamydia* Bn₉は細胞に侵入し核周囲にて活発に分裂増殖できることを見つけた(図8)(未発表データ)。しかしながら原始クラミジアの成熟は不完全であり、周辺細胞への二次感染は起こらない(未発表データ)。何故、低温下で原始クラミジアはヒト細胞に侵入し不完全ながらも増殖できるようになるのだろうか。クラミジアの細胞への侵入にはIII型分泌装置を介して細胞質に打ち込まれるエフェクターTARPへのグアニンヌクレオチド交換因子(VAV)の結合を介したRho GTPaseの活性化に伴うアクチン重合が必要である¹⁹⁾。しかしながらいずれの原始クラミジアゲノムにもTARPホモログは存在せず、未知エフェクターとVAVの結合を介してアクチン重合が促進されている可能性がある。また感染細胞の脂質を利用し成熟するクラミジアは、その菌体周囲に形成した“封入体膜”へ宿主細胞のCERT(脂質輸送蛋白)とSMS(スフィンゴ脂質合成酵素)を、エフェクターIncを巧みに利用し動員していることが明らかにされた²⁰⁾。競合するエフェクターの存在は脂質の獲得に障害を与えている可能性がある。現在VAV、CERT、SMSと会合する菌体エフェクター分子を原始クラミジアのゲノム情報を基に見つけ出す作業を現在進めている。

7. 今後の展望

病原性クラミジアは長い年月をかけ、感染細胞の監視ネットワークに捉えられ易い分子を捨てることで哺乳細胞への適応進化に成功したと考えられる。失った分

子を見つけその機能を紐解く作業は細胞寄生性病原体の細胞内生存戦略を理解する上で極めて興味深い研究の方向性であるが、失った分子を病原性クラミジア自身から求めことはできない。そこで私達は独自に株化した原始クラミジアのエフェクター分子の機能解析からその手掛かりを探っている。幾つかの原始クラミジアのゲノム解読も並列して進めているが、ユニークなゲノム構造やその配列から蛋白・蛋白相互作用に関わるロイシンリッチリピートやアンキリンモチーフを含む機能未知の分子が多数同定されている。これら分子中にはクラミジアの進化を説明するものや、細胞内に侵入する病原体の制御に極めてクリティカルな機能を保有するものが含まれているものと期待している。まだ研究は始まったばかりである。

本研究プロジェクトは松尾淳司先生(北海道大学保健科学研究院)、中村眞二先生(順天堂大学医学研究科)、林田京子先生(北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター)、杉本千尋先生(北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター)、黒田誠先生(国立感染症研究所)、関塚剛史先生(国立感染症研究所)、竹内史比古先生(国立感染症研究所)、永井宏樹先生(大阪大学微生物病研究所)との共同研究として進められています。また研究に関わってくれた多くの大学院生に深謝します。

参考文献

- Horn, M. *Annual Review of Microbiology*. 2008, 62, 113-131.
- Horn, M.; Collingro, A.; Schmitz-Esser, S.; Beier, C.L.; Purkhold, U.; Fartmann, B.; Brandt, P.; Nyakatura, G.J.; Droege, M.; Frishman, D.; Rattei, T.; Mewes, H.W.; Wagner, M. *Science*. 2004, 304, 728-730.
- Zhang, J.P.; Stephens, R.S. *Cell*. 1992, 69, 861-869.
- Raulston, J.E.; Davis, C.H.; Paul, T.R.; Hobbs, J.D.; Wyrick, P.B. *Infection and Immunity*. 2002, 70, 535-543.
- Kim, J.H.; Jiang, S.; Elwell, C.A.; Engel, J.N. *PLoS Pathogenesis*. 2012, 7, e1002285.
- Clifton, D.R.; Fields, K.A.; Grieshaber, S.S.; Dooley, C.A.; Fischer, E.R.; Mead, D.J.; Carabeo, R.A.; Hackstadt, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004, 101, 10166-10171.
- Jewett, T.J.; Fischer, E.R.; Mead, D.J.; Hackstadt, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006, 103, 15599-15604.
- Scidmore-Carlson, M.A.; Shaw, E.I.; Dooley, C.A.; Fischer, E.R.; Hackstadt, T. *Molecular Microbiology*. 1999, 33, 753-765.
- Beatty, W.L. *Journal of Cell Science*. 2006, 119(2), 350-359.
- Byrne, G.I.; Ojcius, D.M. *Nature Review Microbiology*. 2004, 2, 802-808.
- Pirbhai, M.; Dong, F.; Zhong, Y.; Pan, K.Z.; Zhong, G. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281, 31495-31501.
- Matsuo, J.; Kawaguchi, K.; Nakamura, S.; Hayashi, Y.; Yoshida, M.; Takahashi, K.; Mizutani, Y.; Yao, Y.; Yamaguchi, H. *Environmental Microbiology Reports*. 2010, 2, 524-533.
- Nakamura, S.; Matsuo, J.; Hayashi, Y.; Kawaguchi, K.; Yoshida, M.; Takahashi, K.; Mizutani, Y.; Yao, Y.; Yamaguchi, H. *Environmental Microbiology Reports*. 2010, 2, 611-618.
- Okude, M.; Matsuo, J.; Nakamura, S.; Kawaguchi, K.; Hayashi, Y.; Sakai, H.; Yoshida, M.; Takahashi, K.; Yamaguchi, H. *Microbes and Environments*. 2012, 27, 423-429.
- Hayashi, Y.; Nakamura, S.; Matsuo, J.; Fukumoto, T.; Yoshida, M.; Takahashi, K.; Mizutani, Y.; Yao, T.; Yamaguchi, H. *Microbiology and Immunology*. 2010, 54, 707-713.
- Ito, A.; Matsuo, J.; Nakamura, S.; Yoshida, A.; Okude, M.; Hayashi, Y.; Sakai, H.; Yoshida, M.; Takahashi, K.; Yamaguchi, H. *PLoS One*. 2012, 7, e30270.
- Jorgensen, I.; Bednar, M.M.; Amin, V.; Davis, B.K.; Ting, J.P.; McCafferty, D.G.; Valdivia, R.H. *Cell Host Microbe*. 2011, 10, 21-32.
- 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. *PLoS One*. 2013, 8, e56005.
- Lane, B.J.; Mutchler, C.; Al Khodor, S.; Grieshaber, S.S.; Carabeo, R.A. *PLoS Pathogenesis*. 2008, 4, e1000014.
- Elwell, C.A.; Jiang, S.; Kim, J.H.; Lee, A.; Wittmann, T.; Hanada, K.; Melancon, P.; Engel, J.N. *PLoS Pathogenesis*. 2011, 7, e1002198.