

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23117002

研究課題名（和文）細菌の原虫・哺乳動物宿主に対する寄生・共生の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis of the intracellular life of bacteria within eukaryotic cells

研究代表者

永井 宏樹 (NAGAI, Hiroki)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：80222173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 75,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトをはじめとする動物や植物などに代表される真核生物の誕生には、細菌が別の細胞内へはいりこんでミトコンドリアや葉緑体になるという、一次共生の成立が鍵となっています。しかしながら、細菌が真核細胞へ侵入するという現象自体は、細菌感染の現場で今日でも日常的に起こっています。本研究では、ヒト病原菌レジオネラ、アメーバ共生菌や病原性細胞内寄生菌とそれらの宿主である真核生物細胞との関わり方を解析することにより、生物が入れ子になって進化を駆動するというマトリョーシカ型進化の第一段階における進化原理の一端を明らかにすることができました。

研究成果の概要（英文）：Primary endosymbiosis, in which bacteria enter (pre-)eukaryotic cells and finally became mitochondria and chloroplasts, plays a critical role in eukaryogenesis. Even today, bacterial invasion into eukaryotic cells takes place every day at sites of infection. In this study, we focused on the relationship between various kinds of intracellular pathogenic/environmental bacteria and their eukaryotic host cells including free-living Acanthamoeba and human cells. We concluded several mechanistic principles which drive the first step of matryoshka-type evolution.

研究分野：細菌学、分子生物学

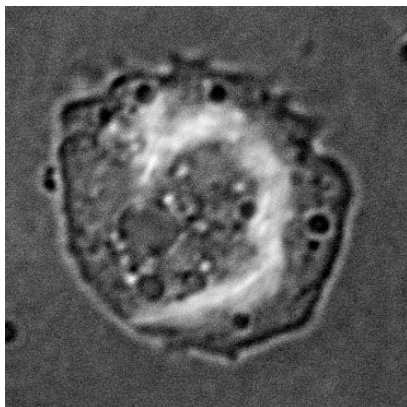
キーワード：細胞内共生 細胞内寄生 細菌 アメーバ

1. 研究開始当初の背景



マトリョーシカ型共生関係の最深部を構成する一次共生への第一段階は、細菌の真核細胞への侵入とそれに続く潜伏・増殖可能なニッチの形成である。一次共生は史上一度だけ起こったと考えられているが、この第一段階は今日においても何らめずらしい現象ではなく、細胞内寄生菌として知られる一部の病原菌による感染成立において日常的に見いだされる。これら病原菌は、宿主細胞内機能をハイジャックすることにより宿主細胞を隷属化させる戦略をとるが、さらに一部の細菌は、その生存が宿主細胞に依存するように進化している。

プロテオバクテリア綱レジオネラ目の細菌は、1)ヒト肺炎レジオネラ症の病原菌であり、アメーバからヒトマクロファージまで非常に広範囲の真核細胞内で増殖するレジオネラ属菌、2)人畜共通感染症の病原菌であり、哺乳動物細胞内で増殖する Q 熱コクシエラ、3)昆虫を宿主とする病原菌・共生菌として知られているリケッチエラ属菌で構成される。これらの細菌はいずれも、宿主細胞内へ細菌タンパク質(エフェクタータンパク質)を注入するための IVB 型と呼ばれる分泌系を持ち、これらエフェクタータンパク質が共生・病原性発現において中心的な役割を果たすと考えられる。このうちレジオネラは、単独で培



アcantアメーバ中で増殖するレジオネラ (「り」の形に見える)

養することも可能で、したがって遺伝子操作が容易であり、宿主細胞との相互作用を分子レベルで解析することに適している。

レジオネラの特徴の一つはアメーバからヒトまでを超えた非常に広い範囲の真核生物細胞中で生存・増殖する能力を保持していることである。この能力は、自然宿主であるアメーバとの相互作用の歴史の中で獲得してきたものだと考えられ、ヒトに病原性があることが認識されたのは、ヒトが空調装置や循環式浴槽等、レジオネラに汚染されたエアロゾルを発生させるデバイスを発明して以降、比較的最近のことである。自然宿主であるアメーバと、偶然による宿主ヒトでは、レジオネラとの関係性が異なると考えられ、その分子基盤を明らかにできれば、細胞内寄生・共生の一端を明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、主として自由生活性アメーバをリザーバー宿主とする病原菌レジオネラと、自然宿主アメーバおよびその共生菌、さらには病気を起こすほ乳類宿主との関係に着目し、細胞内寄生・共生を可能にする分子基盤、さらには細胞内寄生・共生を駆動する進化原理に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 宿主依存性を決定するレジオネラ因子の解析

細胞内寄生菌であるレジオネラと、自然宿主アメーバ・偶然の宿主ほ乳類細胞との関わりの異同について、これに関わるレジオネラ因子を探索・解析する。

(2) アメーバ側の寄生・共生・病原体に対する生存戦略の解析

レジオネラに対する抵抗性を付与するアメーバ共生菌について、トランスクリプトームやプロテオーム等の手法により解析する。

(3) 細胞内寄生・共生を駆動する進化原理の解析

細胞内寄生菌のゲノム進化原理の一端を明らかにすることを目指し、比較ゲノム解析を行う。

4. 研究成果

(1) 宿主依存性を決定するレジオネラ因子の解析

我々は当初、自然宿主であるアメーバ中では必須であるが、偶然の宿主ヒト細胞中では必要ないエフェクタータンパク質が多数存在すると考えた。そのような「アメーバ特異的」エフェクタータンパク質を網羅的に同定するため、約 300 存在するエフェクター遺伝

子を網羅的に破壊し、各種宿主細胞中での生存・増殖を指標にスクリーニングを行った。この結果、遺伝子欠損によりアメーバ中での増殖能のみが有意に減弱するエフェクター遺伝子を2種見出した。この数はレジオネラ全エフェクター遺伝子の数を比較すると、予想外に小さいものであった。また、同定した2つのエフェクタータンパク質の宿主細胞中での機能の検討を行ったが、本研究期間中に明らかにすることができなかった。

以上の結果は、当初の予想とは異なり、宿主の異同はエフェクターにより決定されていないことを示唆していた。このため、探索の範囲を全遺伝子に広げることとした。トランスポゾン挿入株ライブラリを作成し、各種宿主への感染前後において、集団中のトランスポゾン挿入点を次世代シーケンサーにより網羅的にプロファイルした。この結果、1) 宿主の種類にかかわらず、IV型分泌装置が宿主内寄生に最重要であること、2) IV型分泌装置およびエフェクターの発現調節系については、当初の予想通り、自然宿主アメーバに適応進化していること、3) それら以外の遺伝子に関して、宿主による必要度に明確な違いは見いだせないことが明らかになった。これらの結果は、レジオネラ目細菌群で非常によく保存されているIV型分泌系が細胞内寄生に必須であることを裏書するとともに、二部の自然宿主との相互作用だけで、広範囲の真核細胞中での生存・増殖を可能とする機構の進化を駆動できることを示唆している。

(2) アメーバ側の寄生・共生・病原体に対する生存戦略の解析

環境中からアカントアメーバを分離すると、その一割程度は様々な細菌が共生していることが知られている。研究分担者の山口はある種のネオクラミジアが共生するアカントアメーバが、レジオネラ感染に対して抵抗性を示すことを見出していた。この三角関係の分子基盤を解明することを目指して、領域支援班(B02班 黒田誠・国立感染症研究所センター長)と連携し、このアメーバ共生菌の比較ゲノム解析を行ったところ、このネオクラミジア S13 株ゲノム中にのみに存在する70個の遺伝子が同定し、そのなかに外膜に存在すると予想されるTon/Tol輸送システムが含まれていることを見いだした。さらに、アメーバへの感染性が異なるレジオネラのゲノム解析を行い、ネオクラミジア S13 が認識するレジオネラ分子の絞り込みを行いつつある。さらに、アメーバ側のトランスクリプトーム・プロテオーム解析により発現変動遺伝子解析を行った結果、ネオクラミジア S13 株共生アメーバでは細胞運動に関わるアクチンの発現が有意に亢進していることが明らかになった。このことは、レジオネラの暴露を受けたネオクラミジア S13 共生アメーバ

は、他のアメーバに比べ容易にシスト化することと関連するかもしれない。今後、アメーバの感染抵抗性の分子基盤の解明をめざして、アメーバを宿主とする巨大ウイルスなどの関連を明らかにしていきたい。

(3) 細胞内寄生・共生を駆動する進化原理の解析

ヒトには多種多様な細菌が生息しており、両者は互いに有益な共生関係を築いている。しかしながら、この中には日和見感染症を引き起こす種のみならず、病原性を示す細菌も数多く潜在している。例えば、結核菌は33%、ピロリ菌や黄色ブドウ球菌は50%のヒトが無症候性キャリアである。研究分担者である丸山はこれまで、A群レンサ球菌(Group A Streptococcus, 以下 GAS と示す)による劇症型感染症の発症メカニズムを解明するために、本菌の全ゲノム解読および比較ゲノム解析、病原因子の機能解析、また、宿主側の免疫機構解析を進めてきた。これに加えて、従来考慮されてこなかった非劇症型株を多数用いた計259株の比較ゲノム解析を実施し、以下の新たな知見が得られた。I) 本種の多様化においては、原核生物の獲得免疫システム(CRISPR)と病原因子の運搬役であるバクテリオファージの関わりが主要な役割を果たし、CRISPRの欠失が一つの種内を大きく2つのグループに分ける要因になることが分かった。II) また、各グループの特徴として、CRISPRを保有するグループはゲノムを構成する遺伝子数がほぼ一定で保守的であるのに対し、CRISPRを欠損したグループはゲノム上に多様なファージの出入りがあり、種としては多数の遺伝子種を保有するが、全株共有の遺伝子種はCRISPR保有型に比べ少なくなっていた。すなわち、「ファージを介したゲノム縮小という新規ゲノム進化機構」の存在を明らかにすることができた。

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)

1. *Maruyama F, Watanabe T, Nakagawa I. Streptococcus pyogenes Genomics. *SourceStreptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* 1, 26866228 (2016) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333426/> 査読有
2. Kubori T, *Nagai H. The Type IVB secretion system: an enigmatic chimera. *Curr Opin Microbiol* 29, 22-29 (2016). doi: 10.1016/j.mib.2015.10.001 査読有
3. Kuroda T, Kubori T, Thanh Bui X, Hyakutake A, Uchida Y, Imada K, *Nagai

- H. Molecular and structural analysis of *Legionella* DotI gives insights into an inner membrane complex essential for type IV secretion. *Sci Rep* **5**, 10912 (2015). doi: 10.1038/srep10912 査読有
4. *Yamaguchi H, Matsuo J, Yamazaki T, Ishida K, Yagita K. Draft Genome Sequence of High-Temperature-Adapted *Protochlamydia* sp. HS-T3, an Amoebal Endosymbiotic Bacterium Found in *Acanthamoeba* Isolated from a Hot Spring in Japan. *Genome Announc* **3**, (2015). doi: 10.1128/genomeA.01507-14 査読有
 5. Kubori T, Koike M, Bui XT, Higaki S, Aizawa S, *Nagai H. Native structure of a type IV secretion system core complex essential for *Legionella* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 11804-11809 (2014). doi: 10.1073/pnas.1404506111 査読有
 6. Ishida K, Sekizuka T, Hayashida K, Matsuo J, Takeuchi F, Kuroda M, Nakamura S, Yamazaki T, Yoshida M, Takahashi K, Nagai H, Sugimoto C, Yamaguchi H. Amoebal endosymbiont *Neochlamydia* genome sequence illuminates the bacterial role in the defense of the host amoebae against *Legionella pneumophila*. *PLoS One* **9**, e95166 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0095166 査読有
 7. 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. *Protochlamydia* induces apoptosis of human HEp-2 cells through mitochondrial dysfunction mediated by chlamydial protease-like activity factor. *PLoS One* **8**, e56005 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0056005 査読有
- [学会発表](計 13 件)
1. 米田千夏、松尾淳司、山崎智弘、大久保寅彦、中村真二、永井宏樹、山口博之、原始クラミジア *Neochlamydia* 共生アメーバにおけるレジオネラ撃退に関わる責任分子の探索、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 23-25 日、大阪市
 2. 永井 宏樹、偶然による病原菌 レジオネラ、共生・寄生物学シンポジウム、2016 年 3 月 5 日、筑波大学
 3. Fumito Maruyama “Strategy of group A streptococci to adapt inside host cell” International Symposium on Intracellular Pathogens 2016.2.5. Yamaguchi, Japan.
 4. Hiroki Nagai, Interdomain protein transfer as a critical mechanism for survival of intracellular bacteria. 2015 International Meeting of "Matryoshka-type Evolution", Sep. 30 - Oct. 2, 2015, Tsukuba University.
 5. Hiroki Nagai, Type IV secretion system as a lethal weapon of bacterial pathogens. The 10th International Symposium of the Institute Network "Towards the next generation research for cancer and Immunology", Jul. 23-24, 2015, Hokkaido University
 6. 永井 宏樹、久堀 智子、Xuan Thanh Bui, 相沢慎一、今田 勝巳、レジオネラ病原性に必須な IV 型分泌装置の構造生物学、第 88 回日本細菌学会総会ワークショップ、2015 年 3 月 26 (26-28) 日、長良川国際会議場 (岐阜)
 7. 永井宏樹、レジオネラ病原性の分子基盤、平成 26 年度第 24 回学会賞受賞者特別講演会、2015 年 1 月 29 日、北里大学 (東京)
 8. 久堀 智子, 永井 宏樹, “Structural analysis of a type IV secretion system core complex essential for bacterial virulence” 第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26 日(26-28)、タワーホール船堀 (東京)
 9. 永井宏樹、久堀智子、Xuan Bui Thanh、小池雅文、桧垣沙緒里、相沢慎一 “ヒト病原菌レジオネラの病原因子輸送装置” 分子遺伝学シンポジウム 2014 新しい生命像を導いた大腸菌遺伝学の系譜、2014 年 3 月 1 日、京都大学北部総合教育研究棟・益川ホール(京都)
 10. Hiroki Nagai, Tomoko Kubori, Masafumi Koike, Saori Higaki and Shin-ichi Aizawa, “Structural analysis of a type IV secretion system core complex essential for bacterial virulence.”, Cold Spring Harbor Asia meeting on Bacterial Infection and Host Defense, Nov. 19, 2013, (18-22) Suzhou, China
 11. Hiroki Nagai, Tomoko Kubori, Masafumi Koike, Saori Higaki, Shin-ichi Aizawa, Takuya Kuroda, Miki Kinoshita, Yumiko Uchida and Katsumi Imada. Structural analysis of the type IVB secretion system. The 8th international conference on *Legionella*, Nov. 1, 2013 (Melbourne, Australia)
 12. Nagai, H., Interdomain protein transport: a critical strategy employed by bacterial pathogens and symbionts、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県), December 13, 2012.
 13. Hiroki Nagai, Type IVB secretion systems of *Legionella* and related bacteria. Deciphering core complex of the type IVB secretion system. XIII

International congress of
bacteriology and applied microbiology,
(Sapporo) Sep. 2011

〔その他〕

アウトリーチ活動 (サイエンス・カフェ)
永井宏樹、ばいきんまんの毒針、マトリョー
シカフェ 06, 07、2014 年 3 月 29-30 日、
Salmon bene (大阪梅田)

ホームページ等

<http://www.matryoshka-evolution.jp>

<http://cafe.matryoshka-evolution.jp>

<http://nagailab.biken.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 宏樹 (NAGAI, Hiroki)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：80222173

(2) 研究分担者

山口 博之 (YAMAGUCHI, Hiroyuki)
北海道大学・保健科学研究所・教授
研究者番号：40221650
(平成 26 年度より)

丸山 史人 (MARUYAMA, Fumito)
京都大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：30423122
(平成 26 年度より)

(3) 研究協力者

Xuan Thanh Bui