

令和元年6月12日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15270

研究課題名(和文) アメーバ共生細菌原始クラミジアのレジオネラ撃退に関わる分子マシナリーの探索

研究課題名(英文) The role of amoebal endosymbiont in predator-prey interactions

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：私達は土壌から難培養性の原始的なクラミジア(*Neochlamydia* S13)が共生する一株のアメーバをクローン化した。このアメーバは共生細菌依存的に天敵レジオネラを撃退する。本研究ではその仕組みとアメーバがそのクラミジアを共生させる必然性を明らかにするために検討した。その結果、このアメーバは共生細菌依存的に天敵レジオネラの取り込みを特異的に阻害することで、レジオネラの感染を回避していることを明らかにした。また興味深いことにこのアメーバは固形寒天培地上で共生細菌依存的にヒト病原細菌(大腸菌やサルモネラ)を表面に固着させ運搬することを発見した。この運搬にはイオン交換輸送体nhaAが関与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アメーバとその共生細菌とが協調してレジオネラの侵入を抑えることによりその感染を阻止する仕組みを明らかにすると共に、このアメーバが共生細菌依存的にヒト病原細菌を背負って運搬する現象を発見した。またこの運搬現象には、大腸菌のnhaAが関与することを突き止めた。これらの研究成果は、共生関係にある宿主と寄生体との相互作用を理解するために有用であり、細胞内寄生性細菌感染症の制御にも応用が可能である。

研究成果の概要(英文)：We explored the role of the endosymbiont in predator-prey interactions using symbiotic amoebae (*Neochlamydia*-symbiotic acanthamoeba: S13 amoebae). As a result, we found here for the first time as follows: 1. the presence of symbiotic *Neochlamydia* S13 inhabited in the S13 amoebae could be responsible for the restriction of phagocytic activity of *Legionella* in specific, resulting in the defense of the amoebae against *Legionella* infection. 2. S13 amoebae required the *Neochlamydia* endosymbiont to backpack human pathogenic bacteria and resist *Legionella* infection on solid agar. These findings might contribute not only to an understanding of the host-parasite relationship, but also to development of a novel strategy against complicated infectious diseases with intracellular parasites.

研究分野：細菌学

キーワード：アメーバ 共生細菌 原始的なクラミジア レジオネラ 運搬現象 ネオクラミジア

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

土壌や水系など自然環境に広く生息するアカントアメーバ(以下アメーバ)の約 10%程度に、難培養性細菌が共生し、その大部分を偏性細胞内寄生性の原始的なクラミジアが占める(1)。一方、アメーバ細胞内環境は、病原細菌が病原性や環境適応機構に関わるさまざまな遺伝子を獲得する場”melting pot”と考えられ(2, 3)、私達はアメーバ内で繰り広げられる共生機構には、ヒト細胞内に潜り込むさまざまな病原細菌と宿主細胞との闘ぎ合いを理解する上で欠かせないが、いまだ厚いベールに包まれ明らかになっていない新たな概念が眠っていると確信している。そこで私達は、札幌の土壌や水系環境から原始クラミジアが共生するアメーバの株化を試み、5株の難培養性細菌が内部共生するアメーバの株化に成功した(4)。興味深いことに原始クラミジア(ネオクラミジア: *Neochlamydia* S13 株)が共生する一株のアメーバは、その共生細菌を除菌するとその増殖が促進したことから、このアメーバは大きなコストを払ってわざわざこのネオクラミジアを内部に共生させていることになる(5)。さらに驚いたことにこのネオクラミジア共生アメーバは、アメーバの天敵レジオネラ(*Legionella pneumophila* JR32 株)を撃退した(6)。また DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析から、レジオネラで刺激したこのネオクラミジア共生アメーバでは、共生細菌のキメラ様遺伝子 peg2639[セリン/スレオニン(Ser/Thr)キナーゼ: C 末端約 260 アミノ酸残基のキナーゼ部分と NCBI データベース上での BLAST 解析で全くヒットしない N 末端約 400 アミノ酸残基をコードする]の発現が増加することを見つけた(未発表)。その一方で、これら知見は、レジオネラ撃退現象そのものにまだ直接結びついていないし、そもそも何故このアメーバがネオクラミジアを共生させる必要があるのか、その必然性は不明である。

2. 研究の目的

一体このネオクラミジアは、このキナーゼを組み込んだどのような分子マシナリーを駆使し、天敵レジオネラを宿主アメーバから排除しているのだろうか。またこのアメーバがネオクラミジアを共生させる必然性は何か。そこで本研究では、ネオクラミジア peg2639 遺伝子の分子機能解析(会合分子の探索)を用いたレジオネラ撃退機構に関わる分子マシナリーの同定とレジオネラの撃退機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

レジオネラとその他菌株: レジオネラ(*Legionella pneumophila*)菌株は、その菌が保持する IV 型分泌装置の欠損による発現の比較を行うため、合わせて以下の 4 株を使用した。JR32 (T4ASS+/T4BSS+/Tra-) 株および IV 型分泌装置をコードする dot/icm が欠損した dotA(T4ASS+/T4BSS-/Tra-) 株(三宅正紀博士より供与)。Lp01(T4ASS-/T4BSS+/Tra+) 株および IV 型分泌装置欠損株である Lp02(T4ASS-/T4BSS-/Tra+) 株(永井広樹博士より供与)。いずれのレジオネラも GFP 発現プラスミド (pAM239)を導入し、蛍光顕微鏡下で容易に可視化できるようにした。また一部の実験では、GFP 発現大腸菌(*Escherichia coli* DH5a)と GFP 発現サルモネラ(*Salmonella Enteritidis* YH0815)、さらにラボストック菌株も使用した。

アメーバ: 札幌の土壌より分離したネオクラミジア(*Neochlamydia* S13)が共生しているアメーバ(*Acanthamoeba*) 株を用いた。またネオクラミジア除菌アメーバも使用した。また -Proteobacteria が共生する S40CH アメーバと温泉より分離した *Protochlamydia* HS-T3 が共生する HS-T3 アメーバも使用した。対象株として C3 アメーバ(*Acanthamoeba castellanii*)を ATCC より購入し用いた。

ネオクラミジア peg2639 遺伝子の組み換え蛋白の作成: GST 融合タンパク質発現用プラスミドベクターである pGEX-6P-1 に Ser/Thr キナーゼの全長およびタンパク質の C 末端部位に存在するキナーゼドメインを欠失させた領域(Δ C)とキナーゼドメインのみを残した配列(Δ N)が挿入されたプラスミドを用いて検討を行った。これらに加えて、同じくタンパク質発現用プラスミドである pMAL-c5x および pET32a(+)ベクターに Ser/Thr キナーゼの全長を導入したプラスミドを作製した。シークエンス後、配列が確認されたプラスミドは *E. coli* BL21(DE3) 株、Rosetta-gamiB(DE3) 株、SHuffle 株に LB 培地上で形質転換し、IPTG 添加にてそれぞれの融合タンパク質の発現を誘導した。培養後、大腸菌を遠心分離により回収し、サンプルバッファーを用いて可溶性分画と不溶性分画に分け、SDS-PAGE により展開し、CBB 染色を行った。

レジオネラと共培養したネオクラミジア共生アメーバの TEM 解析: ネオクラミジア S13 共生アメーバとその除菌アメーバにレジオネラ JR32 株を添加し共培養した(PYG 培地中に gentamicin を添加しアメーバに感染していないレジオネラは殺滅)。その後レジオネラ共培養ネオクラミジア S13 共生アメーバとその除菌アメーバを 30 で 72 時間後に回収し、3%グルタルアルデヒドを含む 0.1M PBS (pH7.4)で固定した。PBS で洗浄後、エタノールで脱水し Epon 813 に包埋し超薄切片をクエン酸鉛と酢酸ウランで 2 重染色を行い、Hitachi H7100 電子顕微鏡で観察した。

ネオクラミジア共生アメーバのレジオネラの取り込み実験: 蛍光顕微鏡下でレジオネラ(GFP 発現株)感染アメーバ数を観察した。対象として GFP 発現大腸菌、パラクラミジア(*Parachlamydia* Bn9)、巨大ウイルス(*Mimivirus*)も用いた(巨体ウイルスは武村政春博士より供与)。

2D-DIGE と LC/MS 解析: レジオネラ感染(感染後 24 時間)・非感染 S13 アメーバを回収後、超音波により破碎し、高速遠心を行い上清を回収した。回収した上清を TCA 沈殿により濃縮し Bradford 法でタンパク質濃度を測定後、等量をそれぞれ Cy3 または Cy5 で標識し、サンプルを

Auto 2D (SHARP)にアプライした。続いて展開したそれぞれゲルの蛍光画像を、Image Analyzerを用いてシグナルを検出した。またその後ゲルを CBB 染色し、レジオネラ感染 S13 共生アメーバと比較してレジオネラ感染 S13 除菌アメーバにおいて染色性の低下が見られたスポットについて、ゲルを切り出し LC/MS によりタンパク質の同定を行った。

DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析: レジオネラ非感染アメーバおよびレジオネラ感染(JR32、 dotA、 Lp01、 Lp02)ネオクラミジア S13 共生アメーバを回収し、総 RNA を抽出した。抽出した総 RNA の純度は、A260/A280 および A260/A230 の値とアガロースゲル電気泳動上での 18S rRNA と 28S rRNA のバンドを確認することで行った。DNA マイクロアレイは北海道システム・サイエンスに委託し、既知のネオクラミジア S13 のドラフトゲノムの配列情報を基にカスタマイズ後(搭載したプローブ数: 6,793 個×5)、各レジオネラ株間でのネオクラミジア S13 遺伝子の発現比較を行った。

固形培地上での細菌運搬現象とレジオネラ撃退現象: アメーバとヒト病原細菌(GFP 発現大腸菌やサルモネラなど)を混合した。その混合液を LB 培地(直径 6cm)の中央に 20 μ L スポットした。また、B-CYE 培地に Lp02 を円形にスタンプし、その中央にアメーバとヒト病原細菌の混合液を 40 μ L スポットした。そして、30 湿潤状態で 15 日間培養し、アメーバの足跡をトランスイルミネーターを用いて、細菌が発する蛍光シグナルを基に可視化した。得られた画像は Image J ソフトウェア(Scion)で解析した。

大腸菌トランスポゾンライブラリーの構築: 大腸菌 DH5 株にトランスポゾン挿入し、カナマイシン添加 LB 寒天培地によって選択された 243 株の変異体ライブラリーを作製した。

4. 研究成果

(1) ネオクラミジア S13 peg2639(Ser/Thr キナーゼ)組み換えタンパクの調整について: DNA マイクロアレイの結果より、レジオネラ非感染ネオクラミジア S13 共生アメーバに対してレジオネラ感染ネオクラミジア S13 共生アメーバにおいて発現が上昇するネオクラミジア S13 遺伝子の候補として peg2639(Ser/Thr キナーゼ)を同定した。そこで候補分子と相互作用する分子を pull-down アッセイで同定する目的で、大腸菌を利用したこの Ser/Thr キナーゼタンパク質の発現の検討を行った。まずタンパク質発現に良く用いられる大腸菌 BL21 (DE3)株に、pGEX-6P-1 ベクターを用いた GST 融合タンパク質として発現させたところ、Ser/Thr キナーゼタンパク質の全長は、ほとんど不溶性分画となった。そこでこの結果を踏まえて、Ser/Thr キナーゼ全長を、キナーゼドメインを欠損させた領域(以後 Δ C)と、キナーゼドメインのみを残した領域(Δ N)とに分けて発現させたところ、前者は可溶性分画に、後者は不溶性分画に移行した。発現に用いたプラスミドや大腸菌菌株、さらにタンパク質発現条件を変え検討したが改善が認められなかった。これらの結果より、このキナーゼタンパクの発現は困難と考えられ、残念ながら pull-down アッセイに使用できるような組み換えタンパク質を得ることはできなかった。

(2) ネオクラミジア S13 共生アメーバは感染率は低いものの除菌アメーバと同様にレジオネラの細胞内での増殖を許容した: 本来アメーバの天敵であるレジオネラをネオクラミジア S13 共生アメーバとその除菌アメーバに感染させると、ネオクラミジア S13 共生アメーバにおいてレジオネラの感染・増殖が有意に低下する(6)。しかしこの抑制は完全なものではなく、わずかながら共生アメーバでもレジオネラの蛍光シグナルが確認されるので、実際にレジオネラが感染したネオクラミジア S13 共生アメーバとその除菌アメーバ内でのレジオネラの形態について、透過型電子顕微鏡(TEM)にて観察を行った。その結果、レジオネラの形態はネオクラミジア共生アメーバも除菌アメーバでは差が認められず、確かにレジオネラのネオクラミジア感染アメーバへの感染率は低いものの除菌アメーバと同様にレジオネラの増殖が見られることが明らかとなった。このことから、ネオクラミジア S13 共生アメーバでのレジオネラの感染抑制は、宿主細胞内で直接ネオクラミジア S13 がレジオネラの増殖を抑制しているのではなく、アメーバの食作用に関わる取り込みに何らかの障害があり、それをネオクラミジア S13 が補う過程で見られる二次的な事象として生じている可能性が示唆された。

(3) ネオクラミジア共生アメーバはレジオネラの取り込みに障害がある: そこでこの仮説を検証するために、GFP を発現する遺伝的な背景の異なる二つのレジオネラ株(Lp01: T4ASS-/T4BSS+/Tra+, Lp02: Lp02, T4ASS-/T4BSS-/Tra+)のアメーバ(ネオクラミジア共生アメーバ、除菌アメーバ、C3 アメーバ)への取り込みについて検討した。その結果、他のアメーバに比べネオクラミジア共生アメーバでは、感染後 72 時間までの間において、いずれのレジオネラの感染率も 10 分の一程度と有意に低値を示した。またアメーバ内菌数も感染率に一致して低値であった。また GFP 発現大腸菌、パラクラミジアそして巨大ウイルス(Mimivirus)をアメーバ(ネオクラミジア共生アメーバ、除菌アメーバ、C3 アメーバ)に添加し観察を行ったところ、ネオクラミジアは他のアメーバと同様に、大腸菌を取り込み、パラクラミジアに感染し、さらに巨大ウイルスのアメーバ内での複製を許容した。これらの結果より、ネオクラミジア共生アメーバで起こるレジオネラの取り込み障害は、レジオネラに特異的に起こっていることが明らかになった。レジオネラはアメーバに感染すると細胞骨格アクチンを分解することが既に分かっている(7)、ネオクラミジア共生アメーバへのレジオネラの感染が起こり難いとすると、レジオネラと共培養したネオクラミジア共生アメーバにおいては、アクチンの分解が認められないと予想される。また同時にレジオネラのアメーバへの取り込みが减弱するのであれば、たとえ遺伝的な背景が異なるレジオネラを感染させても、アメーバ内に共生するネオクラミジアはそ

の感染の刺激を受けることなくゲノム上の遺伝子発現には大きな変化が認められないはずである。そこでネオクラミジア共生アメーバのレジオネラの選択的な取り込み障害の現象をさらに確固たるものにするために、プロテオーム解析とトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、プロテオーム解析では予想通りネオクラミジア共生アメーバではたとえネオクラミジアを感染させてもアクチンの分解は認められず、またトランスクリプトーム解析ではいずれのレジオネラを感染させたアメーバにおいてもその内部共生細菌であるネオクラミジアの遺伝子発現変化の差は僅かであった。これらの結果より、ネオクラミジア共生アメーバには、レジオネラに特異的な取り込み障害があることが更に裏付けられ、このネオクラミジア共生アメーバがその障害を利用してレジオネラの感染に対抗していることが明らかになった。

(4) 固形培地上でネオクラミジア共生アメーバはヒト病原細菌を背負って運搬しレジオネラの壁を突破した：既に述べたように、ネオクラミジア共生アメーバは、その共生細菌を抗菌剤で除菌すると、宿主アメーバの増殖スピードが増す(5)。すなわちネオクラミジアとの共生そのものはアメーバに少なからず悪影響を及ぼしている。それにもかかわらず何故このアメーバはネオクラミジアの共生を許容するのか。一方、自然環境中ではこのようなアメーバは無数の細菌と共に微小な生態系を構築していると考えられ、周囲に存在する細菌との相互作用がこのようなアメーバに生存を優位にするための何らかのメリットを付与している可能性がある。そこで自然生息環境である土壌により近い固形培地条件で、ネオクラミジア共生アメーバとヒト病原細菌(GFP 発現大腸菌とサルモネラ)との相互作用について検討を行った。その結果、培養日数に依存して、ネオクラミジア共生アメーバと共に添加した細菌の集落がシャーレの周囲へと移動し、培養日数が経過するにつれて、次第に花が開くような形に広がりを見せた。一方で、共生細菌が存在しない除菌アメーバや C3 アメーバではこのような現象は認められなかった。また固形培地上でのアメーバの軌跡を長時間観察すると、除菌アメーバと比較してより多くのネオクラミジア共生アメーバがアメーバと細菌の混合液滴下箇所から這い出した軌跡が確認され、細菌集落はアメーバの軌跡に沿って形成されていることが判明した。さらに走査型電子顕微鏡でアメーバ表面を観察したところ、ネオクラミジア共生アメーバ表面に多数の大腸菌集塊が付着していた。さらにこの現象のメカニズムを解明するために大腸菌トランスポゾンライブラリー(243 株)を構築した。スクリーニングの結果、運搬現象が認められない変異株一株を見出した。トランスポゾン挿入部位を Arbitrarily pair PCR にて特定し、この領域の塩基配列を BLASTn の遺伝子データベースと照合したところ、*nhaA* 遺伝子(Na⁺/H⁺ アンチポーター)と一致した。またこの欠損株の TEM 像から、変異株では菌体長が顕著に長くなっていた。これらの結果より、このネオクラミジア共生アメーバは大腸菌などヒト病原細菌を生きたまま背負って固形培地上を運搬することが明らかになった(この現象は、これまでに全く報告がない新たな微生物相互作用の発見である)。この運搬現象は、アメーバ側には周囲の栄養素の枯渇に対抗するための非常食の備蓄であり、運ばれる細菌側にとっては、生息域拡大の一助となる。一方で、この運搬現象は当初は想定していなかったが、運搬される細菌の集落の軌跡をトレースすることで、固形培地上でのアメーバの数や動きを容易に可視化することを可能にした。レジオネラのアウトブレイクが起こる温水中のアメーバ数の定量系の開発に結び付く有益な発見である。ネオクラミジア共生アメーバの運搬現象における大腸菌 *nhaA* 遺伝子の役割については、現段階では不明である。今後、更なる検討を進めていきたい。

(引用文献)

1. Collingro A, Tischler P, Weinmaier T, Penz T, Heinz E, Brunham RC, Read TD, Bavoil PM, Sachse K, Kahane S, Friedman MG, Rattei T, Myers GS, Horn M. Unity in variety--the pan-genome of the Chlamydiae. *Mol Biol Evol.* 2011 Dec;28(12):3253-70.
2. Moliner C, Fournier PE, Raoult D. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 2010 May;34(3):281-94.
3. Ogata H, La Scola B, Audic S, Renesto P, Blanc G, Robert C, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D. Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. *PLoS Genet.* 2006 May;2(5):e76.
4. Matsuo J, Kawaguchi K, Nakamura S, Hayashi Y, Yoshida M, Takahashi K, Mizutani Y, Yao T, Yamaguchi H. Survival and transfer ability of phylogenetically diverse bacterial endosymbionts in environmental *Acanthamoeba* isolates. *Environ Microbiol Rep.* 2010 Aug;2(4):524-33.
5. Okude M, Matsuo J, Nakamura S, Kawaguchi K, Hayashi Y, Sakai H, Yoshida M, Takahashi K, Yamaguchi H. Environmental chlamydiae alter the growth speed and motility of host acanthamoebae. *Microbes Environ.* 2012;27(4):423-9.
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.* 2014 Apr 18;9(4):e95166.
7. Liu Y, Zhu W, Tan Y, Nakayasu ES, Staiger CJ, Luo ZQ. A *Legionella* Effector Disrupts Host Cytoskeletal Structure by Cleaving Actin. *PLoS Pathog.* 2017 Jan 27;13(1):e1006186.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

1. Matsuo J, Sakai K, Okubo T, Yamaguchi H. *Chlamydia pneumoniae* enhances Interleukin 8 (IL-8) production with reduced azithromycin sensitivity under hypoxia. *APMIS.* 2019 Mar;127(3):131-138. (査読有)
2. Matsuo J, Haga S, Hashimoto K, Okubo T, Ozawa T, Ozaki M, Yamaguchi H. Activation of caspase-3 during *Chlamydia trachomatis*-induced apoptosis at a late stage. *Can J Microbiol.* 2019 Feb;65(2):135-143. (査読有)
3. Yano R, Okubo T, Shimoda T, Matsuo J, Yamaguchi H. A simple and short microbiology practical improves undergraduate nursing students' awareness of bacterial traits and ability to avoid spreading infections. *BMC Med Educ.* 2019 Feb 11;19(1):53. (査読有)
4. Matsushita M, Okubo T, Hasegawa T, Matsuo J, Watanabe T, Iwasaki S, Fukumoto T, Hayasaka K, Akizawa K, Shimizu C, Yamaguchi H. *Tetrahymena* promotes interactive transfer of carbapenemase gene encoded in plasmid between fecal *Escherichia coli* and environmental *Aeromonas caviae*. *Microbiol Immunol.* 2018 Nov;62(11):720-728. (査読有)

5. Yamaguchi Y, Okubo T, Matsushita M, Wataji M, Iwasaki S, Hayasaka K, Akizawa K, Matsuo J, Shimizu C, Yamaguchi H. Analysis of adult damselfly fecal material aids in the estimation of antibiotic-resistant *Enterobacteriales* contamination of the local environment. PeerJ. 2018 Oct 16;6:e5755. doi: 10.7717/peerj.5755. (査読有)
6. Sakai K, Matsuo J, Watanabe T, Okubo T, Nakamura S, Yamaguchi H. Subtle changes in host cell density cause a serious error in monitoring of the intracellular growth of *Chlamydia trachomatis* in a low-oxygen environment: Proposal for a standardized culture method. J Microbiol Methods. 2018 Oct;153:84-91. (査読有)
7. Taki K, Watanabe T, Matsuo J, Sakai K, Okubo T, Matsushita M, Abe K, Minami K, Yamaguchi H. Impact of bacterial traces belonging to the *Enterobacteriaceae* on the prevalence of *Chlamydia trachomatis* in women visiting a community hospital in Japan. J Infect Chemother. 2018 Oct;24(10):815-821. (査読有)
8. Watanabe T, Yamazaki S, Maita C, Matushita M, Matsuo J, Okubo T, Yamaguchi H. Lateral Gene Transfer Between Protozoa-Related Giant Viruses of Family *Mimiviridae* and *Chlamydiae*. Evol Bioinform Online. 2018 Jul 17;14:1176934318788337. doi: 10.1177/1176934318788337. (査読有)
9. Okubo T, Matsushita M, Nakamura S, Matsuo J, Nagai H, Yamaguchi H. *Acanthamoeba* S13WT relies on its bacterial endosymbiont to backpack human pathogenic bacteria and resist *Legionella* infection on solid media. Environ Microbiol Rep. 2018 Jun;10(3):344-354. (査読有)
10. Maita C, Matsushita M, Miyoshi M, Okubo T, Nakamura S, Matsuo J, Takemura M, Miyake M, Nagai H, Yamaguchi H. Amoebal endosymbiont *Neochlamydia* protects host amoebae against *Legionella pneumophila* infection by preventing *Legionella* entry. Microbes Infect. 2018 Apr;20(4):236-244. (査読有)
11. Matsuo J, Nakamura S, Okubo T, Fukui M, Yamaguchi H. Long-term survival of *Naegleria polaris* from Antarctica after 10 years of storage at 4 °C. Parasitol Res. 2018 Mar;117(3):937-941. (査読有)
12. Yamakawa K, Matsuo J, Okubo T, Nakamura S, Yamaguchi H. Impact of capsaicin, an active component of chili pepper, on pathogenic chlamydial growth (*Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*) in immortal human epithelial HeLa cells. J Infect Chemother. 2018 Feb;24(2):130-137. (査読有)
13. Okubo T, Osaki T, Nozaki E, Uemura A, Sakai K, Matushita M, Matsuo J, Nakamura S, Kamiya S, Yamaguchi H. Walker occupancy has an impact on changing airborne bacterial communities in an underground pedestrian space, as small-dust particles increased with raising both temperature and humidity. PLoS One. 2017 Sep 18;12(9):e0184980. (査読有)
14. Yano R, Shimoda T, Watanabe R, Kuroki Y, Okubo T, Nakamura S, Matsuo J, Yoshimura S, Yamaguchi H. Diversity changes of microbial communities into hospital surface environments. J Infect Chemother. 2017 Jul;23(7):439-445. (査読有)
15. Okubo T, Matushita M, Ohara Y, Matsuo J, Oguri S, Fukumoto T, Hayasaka K, Akizawa K, Shibuya H, Shimizu C, Yamaguchi H. Ciliates promote the transfer of a plasmid encoding *bla*(NDM-5) from *Escherichia coli*, isolated from a hospital in Japan, to other human pathogens. Int J Antimicrob Agents. 2017 Mar;49(3):387-388. (査読有)
16. Fukumoto T, Matsuo J, Okubo T, Nakamura S, Miyamoto K, Oka K, Takahashi M, Akizawa K, Shibuya H, Shimizu C, Yamaguchi H. *Acanthamoeba* containing endosymbiotic chlamydia isolated from hospital environments and its potential role in inflammatory exacerbation. BMC Microbiol. 2016 Dec 15;16(1):292. (査読有)
17. Maita C, Matushita M, Okubo T, Matsuo J, Miyake M, Nagai H, Yamaguchi H. Draft Genome Sequences of *Legionella pneumophila* JR32 and Lp01 Laboratory Strains Domesticated in Japan. Genome Announc. 2016 Aug 4;4(4). (査読有)

【学会発表】(計 34 件)

1. T. Okubo, T. Shimoda, R. Yano, S. Nakamura, J. Matsuo, H. Yamaguchi: *Staphylococcus aureus* prompts *Escherichia coli* survival under dry conditions: A potential threat from the viewpoint of nosocomial infection. ASM Microbe 2018. Atlanta, USA, 2018.6.
2. M. Matsushita, T. Okubo, J. Matsuo, S. Nakamura, H. Yamaguchi: Ciliates promote the interactive transfer of plasmid encoding *bla*_{NDM-5} between human pathogenic *Escherichia coli* and environmental *Aeromonas caviae*. ASM Microbe 2018. Atlanta, USA, 2018.6.
3. K. Sakai, J. Matsuo, T. Okubo, S. Nakamura, H. Yamaguchi: Subtle change of host-cell density causes fatal error on monitoring the intracellular growth of *Chlamydia trachomatis* in a low-oxygen environment. ASM Microbe 2018. Atlanta, USA, 2018.6.
4. J. Matsuo, S. Haga, T. Okubo, S. Nakamura, T. Ozawa, M. Ozaki, H. Yamaguchi: Cyclic Luciferase Probe Reveals Caspase-3 Activation in *Chlamydia*-Infected Cells At Late Times During Infection. ASM Microbe 2018. Atlanta, USA, 2018.6.
5. 酒井昂平, 松尾淳司, 渡辺宜典, 大久保寅彦, 中村真二, 山口博之: 低酸素環境において *Chlamydia trachomatis* の感染動態を修飾する要因: 感染実験の成否を握る鍵は何か. 第 91 回日本細菌学会総会. 福岡, 2018.3.
6. 松下瑞江, 松尾淳司, 大久保寅彦, 山口博之: 織毛虫はヒト病原細菌と水系環境細菌を双方向的な薬剤耐性プラスミドの接合伝達の促進作用を介して結ぶ. 第 91 回日本細菌学会総会. 福岡, 2018.3.(ポスター発表優秀賞受賞)
7. 松尾淳司, 大久保寅彦, 中村真二, 山口博之: *Chlamydia trachomatis* は、感染後期に宿主細胞のカスパーゼ 3 を活性化する. 第 91 回日本細菌学会総会. 福岡, 2018.3.
8. 大久保寅彦, 中村真二, 松尾淳司, 山口博之: 病院で用いられる乾燥床材上における細菌間の闘ぎ合い: 残存生菌数と ATP 量のギャップから紐解く細菌の生存戦略. 第 91 回日本細菌学会総会. 福岡, 2018.3.
9. 渡辺宜典, 大久保寅彦, 大崎敬子, 松尾淳司, 神谷茂, 山口博之: 札幌地下歩行空間における空気中浮遊細菌叢の解析: 通行人は浮遊細菌叢に影響を与える. 第 91 回日本細菌学会総会. 福岡, 2018.3.
10. H. Yamaguchi: Interaction between protozoa and bacteria evokes a novel paradigm on understanding unseen life. the 2017 TMU Medical Laboratory Forum. 2017. 12.
11. 山口 博之: 闘ぎ合う原生生物と細菌から学ぶ . 学友会企画・ランチオンシンポジウム「環境微生物の驚くべき世界」東京, 2017. 12.
12. 山口 博之, 大久保寅彦, 松尾淳司: 教育講演: 織毛虫やアメーバと細菌(環境クラミジアを含む)との闘ぎ合いから紐解く微生物間相互作用. 第 35 回日本クラミジア研究会. 東京, 2017.9.
13. 山崎すみれ, 松尾淳司, 大久保寅彦, 中村真二, 山口博之: 原生動物関連巨大ウイルス *Mimiviridae* 科が環境クラミジアの進化に与えた影響について. Update. 第 35 回日本クラミジア研究会. 東京, 2017.9.
14. 松尾淳司, 大久保寅彦, 中村真二, 山口博之: *Chlamydia* 感染とアポトーシス: DEVE 配列挿入環状ルシフェラーゼ発現細胞でのカスパーゼ 3 の活性化測定. 第 35 回日本クラミジア研究会. 東京, 2017.9.
15. 瀧 圭介, 渡辺宜典, 酒井昂平, 松尾淳司, 大久保寅彦, 中村真二, 阿部清孝, 南 邦弘, 山口博之: 膣腔管スワブからの性器クラミジアの検出頻度と菌叢解析について. 第 35 回日本クラミジア研究会. 東京, 2017.9.
16. 酒井昂平, 松尾淳司, 渡辺宜典, 大久保寅彦, 中村真二, 山口博之: 低酸素条件培養下での *Chlamydia trachomatis* の感染動態について. 第 35 回日本クラミジア研究会. 東京, 2017.9.
17. J. Matsuo, K. Taki, T. Okubo, K. Abe, K. Minami, H. Yamaguchi: Degree of virginal inflammation has minimal impact on the prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection on female genital tract. ASM Microbe 2017. NewOrend, USA, 2017.6.
18. M. Matsushita, C. Maita, T. Okubo, J. Matsuo, S. Nakamura, H. Nagai, H. Yamaguchi: Endosymbiotic bacterium *Neochlamydia* restricts host amoebal phagocytosis via actin stabilization, resulting in the defense of the host amoebae against *Legionella* infection. ASM Microbe 2017. NewOrend, USA, 2017.6.
19. K. Sakai, T. Okubo, J. Matsuo, S. Nakamura, H. Yamaguchi: Synergistic effect of walkers with other factors on changing airborne bacterial communities in a built environment, Sapporo underground pedestrian space. ASM Microbe 2017. NewOrend, USA, 2017.6.
20. H. Yamaguchi, S. Yamazaki, J. Matsuo, T. Okubo: Impact of Protozoa-related Giant Viruses on Environmental Chlamydial Evolution with Divergent in the Amoebal Niche. ASM Microbe 2017. NewOrend, USA, 2017.6.
21. 大久保寅彦, 松下瑞江, 松尾淳司, 山口博之 (シンポジウム 07. マイクロブトランスファー: 動的な視点から紐解く微生物学の新たな展開): 北海道大学病院にて分離された NDM 産生大腸菌の性状解析と織毛虫を介したによるプラスミド伝達の促進. 第 90 回日本細菌学会総会. 仙台, 2017.3.19-21.
22. 松尾淳司, 中村真二, 大久保寅彦, 山口博之 (シンポジウム 07. マイクロブトランスファー: 動的な視点から紐解く微生物学の新たな展開): ヒトの移動に伴い院内に持ち込まれるアメーバ共生細菌とヒトへのリスク. 第 90 回日本細菌学会総会. 仙台, 2017.3.19-21.
23. 山川和也, 松尾淳司, 大久保寅彦, 中村真二, 山口博之. 唐辛子の辛味成分 Capsaicin による *Chlamydia trachomatis* の HeLa 細胞内増殖抑制効果とその機序について. 第 90 回日本細菌学会総会. 仙台, 2017.3.19-21.
24. 酒井昂平, 松尾淳司, 山川和也, 大久保寅彦, 中村真二, 山口博之. 低酸素環境における *Chlamydia trachomatis*

- 感染細胞の遺伝子発現解析. 第 90 回日本細菌学会総会. 仙台、2017.3.19-21.
25. 瀧圭介, 松尾淳司, 大久保寅彦, 山口博之. 生殖器スワブを用いた性器クラミジアを上向性へ感染拡大させる要因探索: 炎症の程度とクラミジアの感染頻度. 第 90 回日本細菌学会総会. 仙台、2017.3.19-21.
 26. 山口博之, 山崎すみれ, 松尾淳司, 大久保寅彦. 巨大ウイルスの存在がクラミジアの適応進化に与えたインパクト. 第 90 回日本細菌学会総会. 仙台、2017.3.19-21.
 27. 米田千夏, 松尾淳司, 大久保寅彦, 中村眞二, 永井広樹, 山口博之. アメーバ共生細菌 *Neochlamydia* S13 はアクチンの安定化を介して宿主アメーバ貪食能を制限している. 第 90 回日本細菌学会総会. 仙台、2017.3.19-21.
 28. 松下瑞江, 松尾淳司, 大久保寅彦, 山口博之. 共生細菌に依存したアメーバによるヒト病原細菌の運搬現象について. 第 90 回日本細菌学会総会. 仙台、2017.3.19-21.
 29. 山口博之: (招聘講演): 原生動物と細菌との闘ぎ合いから紐解くパラダイム. 札幌微生物学系合同セミナー. 札幌、2016.12.12.
 30. 山口博之: (ミニシンポジウム): 環境クラミジア Overview: 環境細菌それとも病原体? 第 34 回日本クラミジア研究会. 東京、2016.9.24.
 31. C. Maita, T. Yamazaki, J. Matsuo, S. Nakamura, T. Okubo, H. Nagai, H. Yamaguchi. Impact of Amoebal Endosymbiont *Neochlamydia* on Host Defense against Harmful *Legionella* Infection and Its Defense Mechanism. アメリカ微生物学会、ボストン、2016.6.17-20.
 32. J. Matsuo, T. Fukumoto, T. Okubo, S. Nakamura, K. Akizawa, H. Shibuya, C. Shimizu, H. Yamaguchi. Amoebal endosymbiont, Protochlamydia isolated from a hospital can induce proinflammatory cytokine IL-8 responses in human immortal HEP-2 cells. アメリカ微生物学会、ボストン、2016.6.17-20.
 33. 大久保寅彦, 松尾淳司, 山口博之. 流通生鮮鶏肉表面上における食中毒菌と原生動物のせめぎ合いの検証. 第 90 回日本感染症学会総会、仙台国際センター、平成 28 年 4 月 15-16 日.
 34. 小栗聡, 松尾淳司, 大久保寅彦, 秋沢宏次, 渋谷 斉, 清水 力, 花輪智子, 神谷 茂, 山口博之. 繊毛虫に捕食された大腸菌は食胞内でクオラムセンシング分子 AI-2 を誘発する: 原生動物と病原細菌の相互作用モデル. 第 90 回日本感染症学会総会、仙台国際センター、2016.4.15-16.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.hs.hokudai.ac.jp/yamaguchi/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 中村 眞二

ローマ字氏名: Nakamura Shinji

所属研究機関名: 順天堂大学

部局名: 医学(系)研究科(研究院)

職名: 助教

研究者番号(8桁): 40207882

(2)研究分担者

研究分担者氏名: 松尾 淳司

ローマ字氏名: Matsuo Junji

所属研究機関名: 北海道医療大学

部局名: 医療技術学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 50359486

(3)研究分担者

研究分担者氏名: 大久保 寅彦

ローマ字氏名: Okubo Torahiko

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 保健科学研究院

職名: 講師

研究者番号(8桁): 90762196

(2)研究協力者

なし

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、研究者個人に帰属されます。