

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670206

研究課題名(和文) 原始クラミジアが共生するアメーバは何故レジオネラの感染から回避できるのか

研究課題名(英文) Defense mechanism of Amoebal endosymbiont Neochlamydia on host defense against harmful Legionella infection

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：自然環境に広く生息するアcant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する。私達は、レジオネラ(Legionella)の感染を阻止する難培養性細菌が共生するアメーバを見つけ、その共生基盤を明らかにするために本研究を行った。その結果、この共生細菌は、レジオネラの分泌装置(T4ASS)分子群を感知し、宿主アメーバの食食機構への修飾作用が、この撃退現象に関与することを発見した。また共生細菌の責任分子候補としてセリンスレオニンキナーゼをコードするキメラ様遺伝子(peg2639)を同定した。

研究成果の概要(英文)：Previous our work has shown that obligate intracellular amoebal endosymbiont Neochlamydia has a critical role into host amoebal defense against harmful Legionella infection, causing amoebal killing. Here, to clarify the defense mechanism, we found a crucial piece that amoebal endosymbiotic Neochlamydia specifically could sense Legionella T4ASS (LvH), but not T4BSS (Dot/Icm), presumably connecting to the host defense against harmful Legionella infection.

研究分野：細菌学

キーワード：共生 原始的なクラミジア アメーバ

1. 研究開始当初の背景

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する。そこで私達は、難培養性細菌が共生するアメーバをモデルとして、共生関係の分子基盤を明らかにするために、アメーバの株化を試み、幾つかの難培養性細菌が共生するアメーバの株化に成功している(Matsuo et al., Environ Microbiol Rep. 2010)。一般的には、これら共生は、感染する細菌と宿主アメーバの間での主要代謝経路や栄養源の確保のために起こると考えられるが、その株化アメーバの中に、共生細菌(*Neochlamydia* S13)を除菌すると増殖・運動スピードは顕著に促進するアメーバ(S13 アメーバ)を見つけた(Okude et al., Microbes Environ, 2012)。この発見は、この共生が成立した理由が、代謝系や栄養源の補完以外に存在することを示唆している。そこで私達は、自然環境に広く分布するアメーバの天敵ともいえるレジオネラ(*Legionella*)の感染からそのアメーバが身を守るために共生が成立したのではと仮説を立て実験を行った。その結果、この共生 *Neochlamydia* がアメーバ(S13 アメーバ)は、レジオネラの感染に抵抗することを見出した(Ishida et al., PLoS ONE, 2014)。除菌したアメーバではこの抵抗性は見られないので、共生菌の存在が、この抵抗性をアメーバ付与する上で、必要不可欠な因子と考えられた(Ishida et al., PLoS ONE, 2014)。一方、レジオネラは細胞壁から突き出た 2 種類の分泌装置(T4ASS と T4BSS)から様々なエフェクター分子を宿主アメーバへと打ち込むことでレジオネラの増殖環境の最適化を行っている。またこれら分泌装置やそれらエフェクター分子は *Neochlamydia* S13 が、レジオネラ撃退現象を惹起する上で、重要な”stimulant”誘引物質と考えられる。

2. 研究の目的

そこで *Neochlamydia*S13 のドラフトゲノム配列をもとに構築した DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析により、共生細菌を介した S13 アメーバのレジオネラの撃退機構に関わる分子基盤を明らかにするために以下の研究を実施した。1) GFP 発現レジオネラを用いた S13 アメーバのレジオネラ撃退現象の可視化する。2) DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により、*Neochlamydia* S13 が感作するレジオネラの誘引分子群を明らかにすると共に、撃退減少に関わる *Neochlamydia* S13 のエフェクター分子候補の選別を行った。

3. 研究の方法

アメーバ: 札幌土壌から株化された S13 アメーバ(*Neochlamydia* S13 が共生)、リファンピシンにより S13 アメーバから共生細菌を除菌したアメーバ(除菌アメーバ)、および ATCC から購入した C3 アメーバ(リファレンス株)

を実験に用いた。いずれのアメーバも PYG 液体培地(グルコース-酵母抽出液-ペプトン含有)にて継代維持した。

GFP 発現レジオネラ: 以下 4 種類の GFP 発現レジオネラ(*L. pneumophila*)を用いた。野生株として JR32(T4ASS+, T4BSS+)を、変異株として JR32Δ(T4ASS+, T4BSS-*dotA のみ欠失)、Lp01(T4ASS-, T4BSS+)および Lp02(T4ASS-, T4BSS-)を用いた。JR32 と JR32Δ は静岡大学の三宅博士より分与。Lp01 と Lp02 は大阪大学微生物研究所の永井博士より分与。

レジオネラのアメーバへの感染実験とレジオネラ撃退減少の可視化: さまざまな MOI でレジオネラをアメーバに感染させ、30°C で 7 週間培養した。通常の蛍光顕微鏡のみならず共焦点レーザー顕微鏡で感染を確認し、感染アメーバ数を算出した。また一部の感染アメーバは電顕でも観察した。

アメーバの蛍光ビーズ貪食実験: FITC 蛍光ラテックスビーズ(約 2-5μm)をアメーバに添加し、一晩 30°C で培養し、蛍光ビーズを取り込んだアメーバ数を算定した。

DNA マイクロアレイ: *Neochlamydia* S13 ドラフトゲノム情報 (BASK01000001-BASK01001342)(Ishida et al., PLoS ONE, 2014)をもとにプローブをデザインし、DNA マイクロアレイをカスタマイズした。最終的に 44K チップ上には 1 遺伝子 1 プローブとして計 20,379 プローブ(5 セット*一部の遺伝子は 5 セット以下)を搭載した。DNA マイクロアレイへのハイブリダイズには、以下のアメーバから抽出した RNA(DNA 除去)を Cy3 で標識し用いた(マイクロアレイのカスタマイズ、ハイブリ、解析共に、北海道システムサイエンスに委託した)。非感染 S13 アメーバ(n=1)、JR32 感染 S13 アメーバ(n=3)、JR32Δ 感染 S13 アメーバ(n=2)、Lp01 感染 S13 アメーバ(n=2)、Lp02 感染 S13 アメーバ(n=2)。スキヤットプロットにて各感染系間の発現シグナルの相関性について比較検討すると共に、JR32 感染時に発現が増加する *Neochlamydia* S13 遺伝子の選別を行った。

4. 研究成果

1) GFP 発現レジオネラを用いた S13 アメーバのレジオネラ撃退現象の可視化

MOI により感染率は異なったが、JR32 と Lp01 を感染させた除菌アメーバと C3 アメーバでは、その細胞内に蛍光顕微鏡下で容易に識別可能な菌塊が観察された(図 1)。その一方で、感染直後(6 時間)で菌塊が認められた(共焦点レーザーと電顕にて、この菌塊がアメーバ表層に形成された菌のデブリではないことを確認している)。JR32Δ、Lp02 のアメーバ感染では、そのようなクラスター形成は認められなかった。S13 アメーバへの感染では、いずれのレジオネラを感染させても菌塊形成(感染直後も)は認められなかった(図 2)。また CFU 法による生菌数算定法でも、S13 アメーバには JR32 と Lp01 共に感染できないこと

が確認された。

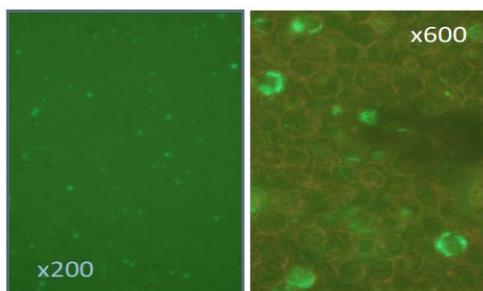


図 1. GFP 発現 Lp01 感染 C3 アメーバの蛍光顕微鏡像(感染 1 日目)

このように、S13 アメーバは、レジオネラを撃退することが再確認された。その撃退現象には、S13 アメーバの低食能が関与している可能性が示唆された。FITC 蛍光ラテックスビーズをアメーバに添加し、一晚 30°C で培養し、蛍光ビーズを取り込量について検討した結果、S13 アメーバではビーズの取り込みが有意に現象し、除菌すると取り込み率は、C3 アメーバと同程度まで回復した。

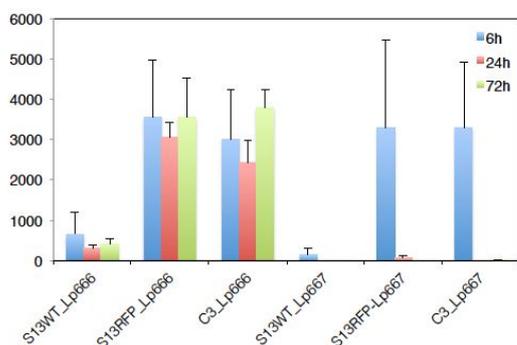


図 2. レジオネラ感染アメーバ数の経日的変化(縦軸は culture あたりの感染アメーバ数)

2) DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析

JR32 を含む感染 S13 アメーバで、発現上昇している幾つかの *Neochlamydia* S13 遺伝子を見つけた。トップヒットしてきた遺伝子は、セリンスレオニン(S/T)キナーゼドメイン含む 600 残基程のアミノ酸をコードする真核生物に広く保存されている遺伝子であった(N 末端側 400 残基は BLASTp でヒットしない未知の配列)。一方、スキャットプロットにて各感染系間の発現シグナルの相関性について比較検討すると、Lp01 と Lp02 感染時の *Neochlamydia* S13 遺伝子の発現パターンが極めて類似していることが明らかになった。

これらの結果より、*Neochlamydia* S13 は、レジオネラが宿主アメーバに感染した際、レジオネラの T4ASS 遺伝子産物あるいはそのエフェクター分子を感知し、撃退現象が惹起されていると考えられた。おそらく

Neochlamydia S13 の S/T キナーゼが、宿主アメーバのアクチンなど細胞骨格を修飾し、その結果として誘発される食能の低下が、撃退現象に関与している可能性がある。

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 6 件)

1: Yamazaki T, Matsuo J, Kikuchi M, Miyamoto K, Oka K, Takahashi M, Takahashi S, Okubo T, Yamaguchi H. Draft Genome Sequence of *Chlamydia trachomatis* Strain 54, Isolated from the Urogenital Tract of a Male in Japan. *Genome Announc.* 2015;3(5). pii: e01242-15. doi: 10.1128/genomeA.01242-15. 査読あり

2: Yamazaki T, Matsuo J, Takahashi S, Kumagai S, Shimoda T, Abe K, Minami K, Yamaguchi H. A characteristic of polymorphic membrane protein F of *Chlamydia trachomatis* isolated from male urogenital tracts in Japan. *J Infect Chemother.* 2015;21(12):842-8. doi: 10.1016/j.jiac.2015.08.016. 査読あり

3: Matsuo J, Nakamura S, Takeda S, Ishida K, Yamazaki T, Yoshida M, Chiba H, Hui SP, Yamaguchi H. Synergistic Costimulatory Effect of *Chlamydia pneumoniae* with Carbon Nanoparticles on NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1 β Secretion in Macrophages. *Infect Immun.* 2015 ;83(7):2917-25. doi: 10.1128/IAI.02968-14. 査読あり

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.* 2015;3(1). pii: e01507-14. doi: 10.1128/genomeA.01507-14. 査読あり

5: Yamane C, Yamazaki T, Nakamura S, Matsuo J, Ishida K, Yamazaki S, Oguri S, Shouji N, Hayashi Y, Yoshida M, Yimin, Yamaguchi H. Amoebal endosymbiont *Parachlamydia acanthamoebae* Bn₉ can grow in immortal human epithelial HEp-2 cells at low temperature; an in vitro model system to study chlamydial evolution. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116486. doi: 10.1371/journal.pone.0116486. 査読あり

6: Ishida K, Matsuo J, Yamamoto Y, Yamaguchi H. *Chlamydia pneumoniae* effector chlamydial outer protein N sequesters fructose biphosphate aldolase A, providing a benefit to bacterial growth. *BMC Microbiol.* 2014;14:330. doi:10.

1186/s12866-014-0330-3. 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

1: 米田千夏、松尾淳司、山崎智弘、大久保寅彦、中村眞二、永井広樹、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、大阪、2016.3.23-25.

2: 山崎智弘、松尾淳司、大久保寅彦、中村眞二、山口博之: WS13 ワークショップ(Bacteria meet Viral Infection) 「*Ureaplasma parvum* の混合感染が生殖器粘膜面での *Chlamydia trachomatis* の生存性に与えるインパクト」. 第 89 回日本細菌学会総会、大阪、2016.3.23-25.

3: 米田千夏、山川和也、山崎智弘、松尾淳司、大久保寅彦、中村眞二、山口博之: トランスクリプトーム解析から探る原始的なクラミジア *Neochlamydia* S13 が共生するアメーバのレジオネラ撃退機構. 第 33 回日本クラミジア研究会、岡山、2015.10.24.

4: Maita C, Matsuo J, Nakamura S, Okubo T, Nagai H, Yamaguchi H: Impact of Amoebal endosymbiont *Neochlamydia* on host defense against harmful *Legionella* infection and its unique defense mechanism. 第 2 回国際シンポジウム・第 4 回マトリョーシカ型生物学会(文部科学省新学術領域研究(領域提案型)), 筑波、2015. 9.30-10.2.

5: 米田千夏、松尾淳司、山崎智弘、大久保寅彦、中村眞二、永井宏樹、山口博之: 原始クラミジア *Neochlamydia* S13 が共生するアメーバはレジオネラを撃退する: トランスクリプトーム解析による責任遺伝子の探索. 第 82 回日本細菌学会北海道支部学術総会. 札幌、2015.9.5.

6: 山口博之: 特別講演 「クラミジアの基礎: クラミジアの持続感染とは何か」. 第 24 回北海道性感染症研究会、札幌、2015. 7.4.

7: Yamazaki T, Ohba H, Takagi N, Matsuo J, Yamaguchi H. Computational based prediction of novel type III secreted effectors in pathogenic chlamydiae. 115th General Meeting American Society for Microbiology, New Orleans, USA. 2015 May 30-June 2.

8: Matsuo J, Kumagai S, Yamazaki T, Takahashi S, Yamaguchi H. Polymorphisms in polymorphic membrane protein F (PmpF) of *Chlamydia trachomatis* isolated from male. 115th General Meeting American Society for Microbiology, New Orleans, USA. 2015 May 30-June 2.

9: Yamaguchi H, Yamane C, Yamazaki T, Ishida K, Matsuo J, Nakamura S. Intracellular growth

mechanism of amoebal endosymbiont environmental chlamydiae *Parachlamydia* Bn₉ in immortalized human epithelial HEp-2 cells at low temperature 30°C. 115th General Meeting American Society for Microbiology, New Orleans, USA. 2015 May 30-June 2.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
山口 博之 (YAMAGUCHI Hiroyuki)
北海道大学・大学院保健科学研究院・教授
研究者番号: 40221650

(2)研究分担者
松尾 淳司 (MATSUO Junji)
北海道大学・大学院保健科学研究院・講師
研究者番号: 50359486

中村 眞二 (NAKAMURA Shinji)
順天堂大学・医学研究科・助教
研究者番号: 40207882

芳賀 早苗 (HAGA Sanae)
北海道大学・大学院保健科学研究院・博士
研究員
研究者番号: 60706505