

学位論文題名

環境クラミジアから病原性クラミジアの付着メカニズムを紐解く—アメーバ放出性因子を利用した*Parachlamydia acanthamoebae*のアメーバ感染宿主細胞へのドミノ様付着メカニズムについて—

学位論文内容の要旨

[要 旨]

細胞内でのみ発育可能な偏性細胞内寄生性細菌クラミジアは系統解析による分類により、大きく2つのグループに分けられている。一つ目のグループは、性感染症の主要原因菌である*Chlamydia trachomatis*や肺炎を惹起する*Chlamydophila psittaci*や*Chlamydophila pneumoniae*などに代表される病原性クラミジアである。もう一方のグループは、自然環境に普遍的に生息している原生動物の一種であるアカントアメーバ(以下アメーバ)を宿主とする*Parachlamydia acanthamoebae*や*Protochlamydia amoebaphila*などの環境クラミジアである。*P. acanthamoebae*の遺伝子が、気管支炎の患者の喀痰又は気管支洗浄液の単核球から検出されたという報告があることから、*P. acanthamoebae*は市中肺炎の原因菌だと疑われている。しかしながら、病原性を規定する確固とした証拠がなく、*P. acanthamoebae*のヒトへの病原性に関しては未だよく分かっていない。

病原性クラミジアと環境クラミジアは同一のクラミジア目に属するが、シアノバクテリアより派生したクラミジアの祖先が今から7億年以上前に分岐し、病原性クラミジアは脊椎動物に、環境クラミジアは原生動物に適応進化してきたと考えられている。興味深いことに、病原性クラミジアは脊椎動物への適応進化の過程でさまざまな分子を捨てゲノムのスリム化が誘導されたと考えられているが、過酷な自然環境に生息するアメーバ共生細菌環境クラミジアのゲノムにはスリム化がみられずゲノムサイズが病原性クラミジアに比べて2倍程度大きい。このことは、環境クラミジアが、進化する過程で受けた選択圧で病原性クラミジアが失ってしまったさまざまなユニークな分子制御基盤をいまだ温存している可能性を暗示している。

病原性クラミジアの感染成立機序には、細胞内に侵入するためにも感染宿主細胞への付着が必須である。それ故、病原性クラミジアの宿主細胞への付着を制御し予防・治療に繋げようと、その付着メカニズムは大変良く調べられている。病原性クラミジアの宿主細胞への付着には、宿主細胞のジスルフィドイソメラーゼの作用により菌体表層に露出したOmcBやGroEL1が宿主細胞上のプロテオグルカン側鎖ヘパリンに結合することが必須とされている。また、なんらかの菌体プロテアーゼにより分解された繊維芽細胞増殖因子fibroblast growth factor 2(FGF2)のFGF2受容体への結合を同時に要求する。しかしながら、宿主細胞や病原性クラミジアの種類によっては必ずしも提唱されているこれらの分子を要求しないので、病原性クラミジアはさまざまな脊椎動物に適応する過程で多様な付着機構を進化させた可能性があり、その全貌はいまだ厚いベールに包まれたままである。

そこで本研究は、病原性クラミジアの付着メカニズム全貌を解明し病原性クラミジアの新たな治療戦略を見出すことを最終目的として、病原性クラミジアの包括的な特徴を持つ環境クラミジアの一種である*P. acanthamoebae*に焦点を当て、その感染宿主であるアメーバへの付着メカニズムを紐解くことにした。まず卒論研究にて、環境クラミジアの生菌数を正確に算定する手法がなくアメーバ内での増殖様式すら正確には分かっていなかったため、環境クラミジアの生菌数算定方法の開発を目指した。その結果、アメーバへの感染率を指標とし簡便でしかも正確な新規生菌数算定方法[Amoeba-infectious units (AIU) 法]を確立し、アメーバ宿主細胞内での*P. acanthamoebae*の生菌数の推移を世界に先駆けモニタリングすることに成功した。博士前期課程では、確立した

生菌数算定方法を用いて*P. acanthamoebae*の感染宿主細胞域に関する検討を行った。アメーバ同様に自然環境に広く分布し原生動物の一種である粘菌や繊毛虫や、哺乳細胞として上皮系ならびに血球系細胞を用いたが、アメーバとの共培養でのみ*P. acanthamoebae*生菌数の増加が認められた。この結果は、限られた培養条件ではあるが、*P. acanthamoebae*の感染宿主域が非常に狭く、本菌がアメーバと共に共進化してきたことを強く示唆していた。

これらの研究成果を踏まえ博士後期課程の研究では、*P. acanthamoebae*のアメーバへの付着メカニズムの解析へと研究を進めた。さまざまなアプローチが考えられたが、進化の過程で選択圧がかかりうる免疫源性のある菌体表層分子を網羅的に釣り上げる必要があったので、*P. acanthamoebae*ホルマリン死菌体に対するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを確立し、モノクローナル抗体の生物学的な性状解析からその付着機構を紐解くことにした。954個のハイブリドーマクローン産生抗体を精査した結果、*P. acanthamoebae*のアメーバへの付着抑制効果を持つ4つのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを確立することに成功した。興味深いことに、これら抗体が認識する分子はすべてアメーバ細胞成分であった。それら分子の局在を精査した結果、アメーバ放出因子やアメーバ表面分子であった。一部の抗体認識分子は、*P. acanthamoebae*が感染したアメーバにおいてその局在が変化し、菌体と共局在を示した。抗体が認識するアメーバ放出分子としては、アメーバが大量に産生するセリンプロテアーゼがその有力な候補と予想されたが、ザイモグラフィの実験によりモノクローナル抗体はプロテアーゼ活性を抑制することはできなかった。その一方で、セリンプロテアーゼ抑制剤が*P. acanthamoebae*のアメーバへの付着を抑制することを見いだした。また付着抑制実験において、プロテアーゼ抑制剤とモノクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体同士の相乗的な付着抑制促進効果は全く認められなかった。以上の結果より、*P. acanthamoebae*のアメーバへの付着には、セリンプロテアーゼを含む複数のアメーバ細胞成分を同時に要求することを明らかになり、私はこのユニークな付着様式を“ドミノ様付着様式”と称し提唱した。モノクローナル抗体が認識している分子の特定には至っていないが、本研究は病原性クラミジアの複雑な付着や侵入機構に新しい論理的枠組みを与えるとともに、細胞内の病原性クラミジアを的確に制御するための方法を見いだす上で重要な知見であると確信している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 清 一
副 査 教 授 森 山 隆 則
副 査 教 授 山 口 博 之

学位論文題名

環境クラミジアから病原性クラミジアの付着メカニズム を紐解く—アメーバ放出性因子を利用した*Parachlamydia acanthamoebae*のアメーバ感染宿主細胞へのドミノ様付着 メカニズムについて—

細胞内でのみ発育可能な偏性細胞内寄生性細菌クラミジアは、呼吸器感染症や性感染症を引き起こす病原細菌である。この感染症は組織の繊維化を促進し、卵管閉塞や気管支喘息さらに動脈硬化といった慢性疾患を惹起しうる。しかしながら病原性クラミジアの菌種間での病原性発動機構が極めて多様であり、治療に直結する病態形成メカニズムはいまだ厚いベールに包まれたままである。一方、近年になって病原性クラミジアの近縁種がアメーバの共生細菌として新たに発見された。この共生細菌は、今から7億年以上前に哺乳動物を含む脊椎動物内で適応進化する道を選んだ病原性クラミジアと分岐し、過酷な自然環境に生息する単細胞生のアメーバ内で進化してきたと考えられ、環境クラミジアと総称されている。興味深いことにゲノム解析から、環境クラミジアゲノムにはスリム化がみられず、環境クラミジアが、進化の過程で多様化した病原性クラミジアの病原因子をフルセットいまだ温存している可能性を示唆しており、病原性クラミジアの宿主細胞との相互作用を紐解く上で極めて有用なモデル系になると考えられた。そこで本研究は、病原性クラミジアの病態形成機構の全貌解明を最終目的として、病原性クラミジアの包括的な特徴を持つ環境クラミジアの一種である *P. acanthamoebae* に焦点を当て、その感染宿主であるアメーバへの付着メカニズムを解明しようとしたものである。

すでに著者は、アメーバへの感染性を指標にした AIU 法と称する *P. acanthamoebae* の生菌数算定方法を確立し、世界に先駆けてアメーバ内での *P. acanthamoebae* の動態を可視化することに成功し、結果を論文にて発表している (Applied Environmental Microbiology, 2008)。続いて、この方法を利用して *P. acanthamoebae* が感染する宿主域を決定し (Microbiology and Immunology, 2010)、*P. acanthamoebae* はアメーバには付着・侵入後活発に増殖する一方で、繊毛虫や細胞性粘菌さらに株化ヒト細胞株 (HEp-2 や THP-1 細胞など) 内で全く増殖できないことを見出した。この研究成果から、*P. acanthamoebae* の宿主域は狭いものの、温存している病原因子を総動員しアメーバへの感染を成立させている可能性を考え、*P. acanthamoebae* とアメーバとの相互作用 (特に付着様式) の解明は、モザイク状に喪失進化した病原性クラミジアの解析に繋がると考えた。

そこでこれらの研究成果をもとに、本研究では *P. acanthamoebae* のアメーバへの付着メカニズムの解析に特化して研究を進めたものである。さまざまなアプローチが考えられたが、進化の過程で選択圧がかかり易い免疫原性の高い菌体表層分子を網羅的に釣り上げる必要があると考え、*P. acanthamoebae* ホルマリン死菌体に対するマウスモノクローナル抗体 (mAb) を産生するハイブリドーマを確立し、mAb の生物学的な性状解析からその付着機構を解析した。その結果、954 個のハイブリドーマを確立し、その中から *P. acanthamoebae* のアメーバへの付着を抑制する 4 つの mAb を選択した。興味深いことに、これら mAb が認識する分子はすべてアメーバ成分であり、認識分子はアメーバ放出因子やアメーバ表面分子と考えられた。また一部の抗体が認識する分子は、アメーバ内外において菌体と共局在した。アメーバは大量にセリンプロテアーゼを産生するが、セリンプロテアーゼ抑制剤存在下で *P. acanthamoebae* のアメーバへの付着が顕著に抑制された。その一方、付着抑制において、抗体同士の相乗的な効果は全く見いだせなかった。以上の結果より、著者は *P. acanthamoebae* のアメーバへの付着には、セリンプロテアーゼを含む複数のアメーバ細胞成分を同時に要求することを明らかにし、“ドミノ様付着様式”と称する極めて新規性の高い付着モデルを提唱した。

以上より、著者はクラミジアの付着機構において新知見を示し、クラミジアの病態形成機構の解明に貢献するところ非常に大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (保健科学) の学位を授与される資格あるものと認める。