細胞内アクチンの重合を利用した 細菌の運動性

東大・医科研・細菌 笹川千尋

1. はじめに

サルモネラなど多くの細菌が鞭毛を使って運動することはよく知られている。しかし病原細菌のなかには通常の培地中では全く運動性を欠如しながら、一旦動物細胞へ入ると活発に動くものがある。この現象は既に30年も前にヒトに血性下痢を起こす赤痢菌でみられていたが、その機序は不明であった¹⁾。しかし細菌病原性の分子遺伝学と細胞の分子生物学が進むにつれて、そのメカニズムが次第に明らかとなってきた。細胞内に侵入した赤痢菌やリステリアは増殖・分裂しつつ菌体の一極でアクチンの重合と凝集を促進し、これを原動力として細胞質内を動き回りまたさらに隣接細胞へも拡散する。このシステムは細菌の運動性あるいは細菌と宿主間のコミュニケーションに新しい概念をもたらしたばかりでなく、哺乳動物細胞におけるアクチンを基にした細胞小器官の運動機構の一モデルとしてもユニークであり、いま細菌と細胞骨格の研究者から共に注目されている。本稿では、この話題に関するこれまでの知見をまとめてみたい。

2. 細菌の細胞侵入

細菌の細胞内運動をみる前に、そこに至るまでの細菌の細胞侵入機構に触れておく。近年になり細菌の多くが動物細胞へ自ら侵入する能力を備えていることが明らかとなり、それらを“侵入性細菌”と便宜上呼ぶことがあるが、赤痢菌もリステリアもそれに属する。いずれも本来食細胞ではない上皮細胞へ接触すると菌の分泌する蛋白（細菌により種類は異なる）の作用により細胞骨格の最構築を促しエンドサイトーシスが誘起され、これを介して菌は細胞内へ侵入する。赤痢菌と細胞表層の接触部位にはアクチンとミオシンの凝集がみられ²⁾、赤痢菌が分泌する IpaB, IpaC, IpaD 蛋白 (Invasion plasmid antigens) がそれに関与してい

ると推定されている^{3), 4)}。またリステリアでは80K の Int 蛋白 (Internalin) が分泌され、これが細胞侵入をもたらすと考えられているが⁵⁾、いずれの場合もその詳しい作用機構はまだ確定していない。細胞侵入に関してこれまでに細菌と細胞のリガンドとリセプターの関係が最も詳しく調べられた例は、エルシニア（仮性結核菌）の産成する Inv 蛋白 (Invasin) である⁶⁾。この蛋白はインテグリンに対して結合性を有しており、エルシニアや、Inv 蛋白を産成・分泌出来るように改変した大腸菌が上皮細胞へ接着するとインテグリンの集合を促進することが知られている。その結果インテグリンと各種蛋白のチロシンリン酸化を通じて細胞骨格の再構築が進み、エンドサイトーシスが誘発されて菌が細胞内へ取り込まれる。

3. 細菌の細胞内運動と細胞間拡散

赤痢菌やリステリアは上皮細胞へ侵入後細胞質内で増殖・分裂しながら活発に動きまわる。感染後1-2時間経つと細胞の表面から長さ10-20 μm の突起 (pseudopod) が出現し、その先端には菌が包まれている。菌の細胞内運動と突起形成は常に随伴しており、またこの突起によって菌は隣接細胞へ移る。即ち運動する赤痢菌やリステリアの一部は細胞の内側から形質膜を突き上げるように長い突起を形成し、これを隣接細胞へ挿入する。この時菌は突起と相手の細胞の二重の形質膜に取り囲まれているが、菌が分泌する膜溶解性蛋白の作用で突起内から新しい細胞質へ脱離し、そこで再び増殖・分裂・運動を繰り返す (図1)。このように一旦侵入した菌は細胞外へ出る事なく次々と周囲

図1 赤痢菌の細胞侵入、細胞内運動、細胞間拡散

エンドサイトーシスにより上皮細胞内に侵入した菌は、ストレスファイバー（棒状に描いたもの）に沿って核膜付近まで移動する（本文中では省略した）²⁰⁾。その後F-アクチンのコメットを菌体の一極に形成しながら、細胞内を移動し隣接細胞へ拡散してゆく。リステリアも赤痢菌と見かけ上よく似た動きを示すが、こちらではストレスファイバーの関与は報告されていない。

Actin filament and intracellular bacterial movement

Chihiro SASAKAWA

Department of Bacteriology, Institute of Medical Science,
University of Tokyo

の細胞へ感染を拡大し、その間感染を受けた細胞は変性・剥離を起こす。その結果単層培養細胞上には1~2日後プラークが形成されるが、これを利用して細胞侵入、細胞内増殖、運動、突起の溶解に関わる変異株が赤痢菌とリステリアから多数単離され、それに関わる遺伝子の構造と機能及び宿主細胞への作用が明らかになりつつある。

4. 細菌のアクチン重合

菌の細胞内運動がアクチンの重合を利用して行われていることは、1989年パスツール研究所の Sansonetti らが赤痢菌で⁷⁾、またペンシルバニア大学の Tilney らがリステリアで初めて報告した⁸⁾。Sansonetti らは、HeLa 細胞へ赤痢菌を感染後サイトカラシン D を添加すると菌の増殖には影響が見られないにもかかわらず菌の運動が停止し、サイトカラシン D を除去すると再び運動性を回復することから、F-アクチンが菌の運動に何らかの関わりがあると推定した。そこで赤痢菌を感染させた HeLa 細胞を界面活性剤で処理し、NBD-ファラジシンとローダミン-赤痢 LPS (リポポリサッカライド) 抗体で二重蛍光染色を行ったところ、菌体の一極に F-アクチンの束がコメット状に凝集していることを認めた⁷⁾。その F-アクチンのコメットにはアクチン架橋因子のプラスチンとさらに赤痢菌が分泌する VirG 蛋白が結合していることが最近報告されている⁹⁾¹⁰⁾。一方赤痢菌感染上皮細胞を超薄切片にして電子顕微鏡観察すると、菌体周囲に細い線維塊が付着し、さらにその線維はしばしば菌体の一極からあたかもロケットの噴射煙状の尾を形成しているのが認められる。感染後1~2時間後には細胞表面に、菌を先頭に頂く F-アクチンのコメットが突起を形成し、隣接細胞へ突入しているものも見られる⁹⁾。これら一連の結果から、赤痢菌は細胞内で何等かの方法でアクチンの重合あるいは F-アクチンの凝集を促進し、これが菌の運動源となっていることが考えられている。

一方細胞骨格の研究をしてきた Tilney らは、リステリアをマクロファージ系培養細胞へ感染後、細胞内の菌の動態を経時的に電子顕微鏡で調べた⁸⁾。感染初期のリステリア菌体周囲は細かい線維で覆われているが、やがて分裂途中の菌体の一極からはしばしば繊維状の密集塊がコメット状に伸びていることを観察した。菌体に付着している線維素の太さは約 5 nm であり、また外から添加したミオシンの S1 フラグメント (S1) で特異的に修飾されることなどから、菌体表面上の凝集塊は F-アクチンであることが示された。S1 による修飾像の解析から、菌体表面あるいはコメットはいず

れも 0.3 μ m 以下の短い F-アクチンの断片からなり、それらはやや不規則ながらも barbed end が菌体の側に向き存在していた。菌体上の F-アクチン凝集は赤痢菌の場合と同様に、分裂菌体の隔壁とは反体の極に近い領域ほど肥厚し、アクチンの重合活性が菌体上均一ではないことを示唆している。一方リステリア感染マクロファージを界面活性剤で処理した後、これに G-アクチンをその重合条件下で添加すると F-アクチンとなって菌体周囲に沈着し、さらに pointed end 臨界濃度以下の G-アクチンを加えると、菌体周囲の F-アクチン barbed end 側で重合が起きることが認められた。しかしこのようなアクチン重合は、細胞外で培養したリステリアでは全く見られない^{11),12),13)}。一方、細胞内リステリアが形成する F-アクチンのコメットには、 α -アクチニンとトロポミオシンが結合していることも報告されている^{14),15)}。これらの結果は、リステリアのアクチン凝集に、菌の分泌する蛋白と宿主細胞の細胞骨格調節因子の両者が不可欠であることを強く示唆している。

5. 細菌の運動とアクチン重合

細菌はアクチンの重合をどのように運動へ利用しているのだろうか。少なくとも生じた F-アクチンには束状形成も、またミオシンの相互作用も起きていないようであるとすれば、アクチンの重合そのものが菌を前方へ押しだす原動力となることが考えられる。これを証明するために Portnoy らはとびねずみの腎上皮細胞 (Ptk2) にリステリアを感染させ、細胞内で菌から派生する F-アクチンのコメットを NBD-ファロイジンで染めその蛍光強度の分布を測定した¹⁶⁾。コメットの F-アクチンの蛍光強度は菌体に近接するほど強く、逆に離れるに従い指数的に減弱していた。次に彼らはそのコメットに取り込まれたアクチンの行方を“パルス-チェイス”の実験で調べた。具体的にはリステリアを感染させた Ptk2 細胞へ、“caged resorfin” (CR) で標識した G-アクチン (CR-アクチン) をマイクロインジェクションし、その後 F-アクチンのコメットに取り込まれた CR-アクチンを局所的 UV 照射で励起標識しその後の時間経過を追跡した。その結果 CR-アクチンの励起蛍光スポットは時間の経過と共にコメットの尾部へと相対的に移動したが、細胞質内での位置は変わらず、逆に菌体のほうが蛍光アクチンのスポットから次第に離れて行くのが観察された。このとき励起アクチンの蛍光強度は、コメットの尾部へ近接するに従い減衰した。Portnoy らはこれらの結果から、コメットでは菌体表面に近い程アクチ

図2 菌体の一極におけるF-アクチンのコメット形成.

ンの重合度が高く、一方菌体から離れるに従い脱重合が促進されると結論し、リステリアは新しいアクチンを菌体表面で重合しつつ相対的に移動してゆくという新しい運動機構を提唱した(図2)。彼らは菌の運動速度がコメットのアクチンの代謝時間(平均33秒)には関係なく、専らコメットの長さに比例していることを示し、最も早い菌の移動速度は $0.4 \mu\text{m}/\text{sec}$ であると述べている¹⁶⁾。

6. 細菌のアクチン重合促進因子

赤痢菌、リステリアの両者において感染細胞内で菌体が分裂する際に隔壁の反対の極でアクチンの凝集活性が高くなることはすでに触れた。リステリアのF-アクチン重合に関わる蛋白はまだ確定していないが、赤痢菌では前に述べたVirG蛋白がこれに関与していることはほぼ疑いない。事実これをコードするvirG遺伝子を不活化した変異株は、感染細胞内に於けるF-アクチンの凝集能と細胞内運動性とを同時に失い、隣接細胞への拡散能ももたない^{7), 17)~19)}。このVirGは1102個のアミノ酸からなり菌体表面に露出している外膜蛋白で、その菌体分布もアクチンの重合で見られたように菌体分裂隔壁の反対に偏在している。またN-末端側から756アミノ酸残基の領域は菌体外にありプロテアーゼにより切断され遊離型VirG蛋白はいずれもF-アクチンへ結合性を示し、また菌体から生じたF-アクチンのコメットに遊離型VirGが結合していることが免疫蛍光法で確認されている(福田ら、未発表データ)。しかしVirG蛋白の菌体上の局在がなぜ起こるのか、またVirGがどのようにアクチンの重合あるいはF-アクチンの凝集に関与するのか、まだ多くの未解決な問いが残っている。

謝辞 本稿を書く機会と、著者らのこれに関連する研究に貴重な御助言をいただいた東大医科研の片山栄作先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Ogawa, H., Nakamura, A., Nakaya, R. (1968) *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **21**, 259-273.
- 2) Clerc, P., Sansonetti, P. J. (1987) *Infect. Immun.* **55**, 2681-2688.
- 3) Sasakawa, C., Adler, B., Tobe, T., Okada, N., Nagai, S., Komatsu, K., Yoshikawa, M. (1989) *Mol. Microbiol.* **3**, 1191-1201.
- 4) High, N., Mounier, J., Prevost, M-C., Sansonetti, P. J. (1992) *EMBO J.* **11**, 1991-1999.
- 5) Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., Cosart, P. (1991) *Cell* **65**, 1127-1141.
- 6) Isberg, R. R., Leong, J. M. (1990) *Cell* **60**, 861-871.
- 7) Bernardini, M. L., Mounier, J., D'Hauteville, H., Coquis-Rondon, M., Sansonetti, P. J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3867-3871.
- 8) Tilney, L. G., Portnoy, D. A. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 1597-1608.
- 9) Prevost, M-C., Lesourd, M., Arpin, M., Vernel, F., Mounier, J., Hellio, R., Sansonetti, P. J. (1992) *Infect. Immun.* **60**, 4088-4099.
- 10) Goldberg, M. B., Barzu, O., Pasort, C., Sansonetti, P. J. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 2189-2196.
- 11) Tilney, L. G., Connelly, P. S., Portnoy, D. A. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 2979-2988.
- 12) Tilney, L. G., DeRosier, D. J., Tilney, M. S. (1992) *J. Cell Biol.* **118**, 71-81.
- 13) Tilney, L. G., DeRosier, D. J., Weber, A., Tilney, M. S. (1992) *J. Cell Biol.* **118**, 83-93.
- 14) Dabiri, G. A., Sanger, J. M., Portnoy, D. A., Southwick, F. S. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6068-6072.
- 15) Sanger, J. M., Sanger, J. W., Southwick, F. S. (1992) *Infect. Immun.* **60**, 3609-3619.
- 16) Theriot, J. A., Mitchison, T. J., Tilney, L. G., Portnoy, D. A. (1992) *Nature* **357**, 257-260.
- 17) Makino, S., Sasakawa, C., Kamata, K., Kurata, T., Yoshikawa, M. (1986) *Cell* **46**, 551-555.
- 18) Lett, M-C., Sasakawa, C., Okada, N., Saki, T., Makino, S., Yamada, M., Komatsu, K., Yoshikawa, M. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 353-359.
- 19) Nakata, N., Sasakawa, C., Okada, N., Tobe, T., Fukuda, I., Suzuki, T., Komatsu, K., Yoshikawa, M. (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 2387-2395.
- 20) Vasselon, T., Mounier, J., Prevost, M. C., Hellio, R., Sansonetti, P. J. (1991) *Infect. Immun.* **59**, 1723-1732.