細胞内寄生菌の感染と膜動輸送

度会雅久

帯広畜産大学 畜産学部獣医学科 応用獣医学講座 〒080-8555 北海道帯広市稲田町

Infection and Membrane Trafficking of Intracellular Bacteria

Masahisa Watarai

Department of Applied Veterinary Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
Inada-cho, Obihiro-shi, Hokkaido 080-8555

Intracellular bacteria are capable of surviving inside macrophages and are thought to actively modify their phagosomes to avoid lysosomal fusion for intracellular survival. Both entry and intracellular growth of *Legionella* and *Brucella* are dependent on an interaction with microdomains of the cellular membranes. These microdomains, commonly referred to as lipid rafts, are enriched in glycosylphosphatidylinositol (GPI) -anchored proteins, glycosphingolipids and cholesterol. Lipid raft-associated molecules are selectively incorporated into phagosomes containing *Legionella* and *Brucella* and treatment of raft-disrupting agents inhibits bacterial internalization and intracellular replication. Since lipid rafts involve in signaling pathway in immune cells, entry processes associated with lipid rafts may lead bacteria into compartments that avoid fusion with the lysosomal network. Plasma membrane cholesterol of macrophages is also required for bacterial proliferation in mice. Thus, lipid raft microdomains not only influence the bacterial internalization and intracellular replication, but also contribute to the establishment of bacterial infection.

Key words : *Legionella* / *Brucella* / macrophage / lipid rafts / membrane / infection / intracellular pathogen

1. はじめに

リピドラフトと呼ばれる細胞膜上に存在するマイクロドメインは多くの生命現象および疾病に関与することが知られるようになり、その存在が認知されつつある¹⁾。最近になって、種々のウイルス、細菌および原虫の感染、特に細胞内寄生性病原体の細胞内侵入にリピドラフトが関与することが報告されている²⁾。これらの病原体の細胞侵入に関与する病原体側因子および宿主細胞側受容体（レセプター）は個々の病原体によって異なるが、細胞侵入時にリピドラフトの形成が共通して認められることには何らかの意義があるのではないかと考えられる (Table 1)。本稿ではリピドラフトが病原微生物感染のゲートウェイとしての役割を持つことに注目して、細菌の感染、特に我々が研究を行っているレジオネラ菌およびブルセラ属菌の細胞侵入を中心に解説する。

2. 病原細菌はマクロファージに取り込まれるのではなく侵入する

マクロファージ等の貪食細胞は病原体あるいは死細胞等の異物を取り込み、消化する機能を有する。これは細胞性免疫の最初のステップであり、取り込まれた異物がファゴソームに包まれ、このファゴソームとリソソームが融合することによって成立する。ところが、いくつかの細胞内寄生菌はこのマクロファージによる消化を回避するためにファゴソームとリソソームの融合を阻止し、その後細胞内で増殖する。あるいはファゴソームとリソソームが融合したとしてもその中で消化されず、耐えて生き残ることができる。このメカニズムは未だ不明な点が多いが、感染成立のための重要な現象であると考えられるため、多くの研究者が注目して研究を行っている。

菌の感染機構におけるファゴサイトーシスはあま

Table 1 Bacterial infection into host cells via lipid rafts.

Bacterial pathogens	Receptors	References
<i>L. pneumophila</i>	Unknown	5
<i>B. abortus</i>	GPI-anchored proteins	7
Pathogenic <i>E. coli</i> (type 1 pili)	CD48	10
<i>S. flexneri</i>	CD44	11
	Integrin	12
<i>Mycobacterium</i> spp.	GPI-anchored proteins	13

り注目されていなかったが、UCLAの Marcus A. Horwitzの研究グループにより、マクロファージがレジオネラ菌の取り込みを行う際に細胞膜表面に存在する分子の選別が引き起こされることを発見した³⁾。即ちファゴソーム内の膜上には特定の分子が局在し、その他の分子は排除される (Fig. 1)。彼等はこの現象をメンブレンソーティング (膜選別) と名付けた。しかしながら、病原株と非病原株におけるメンブレンソーティングの差異が不明確だったため、菌の感染機構における意義を示すことはできなかった。

それから数年後、レジオネラ菌の病原株と非病原株におけるメンブレンソーティングの差異が明確にされ、病原株はマクロファージに受動的に取り込まれるのではなく、むしろ能動的に侵入すると考えられるようになった。このメンブレンソーティングにリピドラフトの関与が示されたことにより、その後の研究が大きく進展しつつある。

3. 細菌の細胞侵入におけるリピドラフトの関与

3.1 レジオネラ菌 *Legionella pneumophila*

レジオネラ菌は細胞内寄生菌であり、肺胞マクロファージ内で増殖することにより肺炎を惹起すると考えられている。マクロファージ内へ侵入した菌はリソソームとの融合を阻止することによって、マクロファージに取り込まれた異物が本来たどるべき経路を回避し、細胞内で増殖可能なレジオネラ菌特有のファゴソームを形成する。最近になってレジオネラ菌のマクロファージ内増殖に関与する一連の蛋白質群 (IV型分泌機構) が同定された⁴⁾。しかしこれらが宿主細胞にどのように作用しているかは不明である。レジオネラ菌は公衆衛生上重要な病原細菌であるが、比較的最近になって認知されてきたため病原機構については未だ多くの謎を残している。

レジオネラ菌の病原性において最も特徴的なのがマクロファージ内での増殖であるが、細胞侵入と細胞内増殖との関わりは殆ど研究されていなかった。そこで我々は野生株とIV型分泌機構の変異株を用いて細胞侵入様式の差異を検討した。その結果、野生

Fig. 1 Model depicting the sorting of membrane proteins during bacterial internalization.

株は細胞侵入時に大きなファゴソーム (マクロピノソーム) を形成するが、変異株は形成しないことを見出した⁵⁾。このマクロピノソーム形成は感染10分後に最も多く認められ、時間の経過と共に減少し、一過性の現象であることが示された。レジオネラ菌によるマクロピノソーム形成のメカニズムは未だ不明であるが、病原株のみに観察されることから病原性との関わりが予測された。

レジオネラ菌の形成するファゴソームに集積する分子の解析を行ったところ、リピドラフトの構成分子である GPI アンカー型蛋白質および GM1 ガングリオシドが集積し、膜貫通型蛋白質が排除されることが認められた。この現象は野生株のみに観察され、IV型分泌機構の変異株では認められなかった。レジオネラ菌の細胞侵入時に認められるリピドラフトの形成は一過性であり、感染10分後に最も多く認められ、時間の経過と共に減少する。これはレジオネラ菌によるマクロピノソーム形成の傾向と類似しており、実際にこのマクロピノソームには高頻度にリピドラフトの形成が認められることから、マクロピノソーム形成とリピドラフト形成という病原株に特異的な現象には相関関係があると推察された。

リピドラフトと菌の細胞内増殖との関係はブルセラ属菌において詳しく述べることとして、ここではレジオネラ菌特有の現象につて解説する。レジオネラ菌のマクロファージ内増殖は近交系マウスの中でも限られた系にのみ認められる⁶⁾。A/Jマウスのマクロファージ内では増殖できるが、その他のBALB/cあるいはC57BL/6マウスのマクロファージ内では増

Fig. 2 Internalization process of *Brucella abortus* into mouse bone marrow-derived macrophages. Selected time-lapse videomicroscopic images of *B. abortus* entry into the macrophages. Elapsed time in minutes is indicated at the bottom of each frame. Arrows point to bacteria. Wild-type (A) and *virB4* mutant (B) observed after contact with macrophage.

殖出来ない。この現象はマウス染色体上に存在する *Lgn1* と呼ばれる領域によって制御されている。レジオネラ菌の細胞侵入時に認められるマクロピノソームおよびリピドラフトの形成は、感染に感受性を示す A/J マウスマクロファージでは観察されるが、感染に抵抗性を示す BALB/c あるいは C57BL/6 マウスマクロファージでは観察されない。さらに、A/J マウスの *Lgn1* 領域を C57BL/6 の *Lgn1* 領域に置換したりコンビナントマウスは感染に抵抗性を示し、菌の細胞侵入時にマクロピノソームおよびリピドラフトの形成も認められない。これらのことから、レジオネラ菌のマクロファージ内増殖にはマクロピノソームおよびリピドラフトを形成する侵入経路が重要な役割を果たすことが予測される。しかしながら、その分子機構には依然不明な点が多く、さらに詳細な解析が必要である。

4. ブルセラ属菌 *Brucella* spp.

ブルセラ属菌は人獣共通感染症の一つであるブルセラ症の原因菌で、ヒトではマルタ熱、牛、豚、山羊などの家畜では流産を惹起する。また、ブルセラ

Fig. 3 Association of cholesterol with macropinosome containing *Brucella abortus*. Big arrow or small arrow point to bacteria or cholesterol.

属菌は細胞内寄生菌であり、その細胞内増殖能と病原性とは密接な関係があると考えられている。しかしながら、ブルセラ属菌の細胞内増殖のメカニズムは未だ不明な点が多い。現在までに知られている主な病原因子は、IV 型分泌機構と呼ばれる因子で、これはレジオネラ菌の保有する IV 型分泌機構と同じグループに属している。従ってブルセラ属菌とレジオネラ菌の細胞内増殖機構には類似点が存在することが予測された。このような観点から、野生株と IV 型

Fig. 4 Tail formation of GPI-anchored proteins on the site of *Brucella abortus* internalization. Arrow or arrow-head point to bacteria or tail-like aggregation of GPI-anchored proteins.

分泌機構の変異株のマクロファージへの侵入を位相差顕微鏡で経時的に観察した。野生株の場合、比較的広い範囲に及ぶ膜のラッフリングと細胞表面を泳ぐ様に移動する菌が認められる。これが数分間続いた後、マクロピノソーム形成が観察される (Fig. 2)⁷⁾。一方、IV型分泌機構の変異株ではこのような現象は認められず、菌は迅速にマクロファージ内に取り込まれる。この結果から、菌の細胞表面での移動は野生株に特異的であり、病原性に何らかの関係があるものと推察された。

マクロピノソーム形成後、メンブレンソーティングが行われるかどうか検討したところ、レジオネラ菌と同様にリピドラフトを構成する分子がマクロピノソーム上に集積し、膜貫通型蛋白質が排除された (Fig. 3)。ブルセラ属菌の細胞侵入時に観察されるリピドラフトの形成も一過性であり、リピドラフトの関与は感染初期における限られた時期に認められた。即ちリピドラフトを形成する細胞侵入経路が菌の細胞内増殖に重要であると考えられる。それを裏付ける結果をいくつか紹介する。細胞表面に存在する GPI アンカー型蛋白質はホスファチジルイノシトール・ホスホリパーゼ C (PI-PLC) によって取り除くことができる。これを応用してマクロファージを PI-PLC で処理し、細胞表面の GPI アンカー型蛋白質を除去した後に菌を感染させた。野生株の細胞侵入は処理した PI-PLC の濃度が上昇するに伴って阻害されたが、IV型分泌機構の変異株では影響を受けなかった。この時、細胞内に侵入した少数の野生株はリソソームと融合し、細胞内で増殖することはできなかった。PI-PLC で処理したマクロファージでは菌の細胞侵入時にリピドラフトの形成は認められないことから、リピドラフトの形成を阻害することによって野生株の細胞侵入および細胞内増殖を阻害することができると考えられた。細胞内からコレステロール

を取り除くサイクロデキストリン、ナイスタチンなどの薬剤でマクロファージを処理した場合において、PI-PLC 処理と同様の結果が得られた。この結果からも、リピドラフトを介した菌の細胞侵入がその後の細胞内増殖に重要な役割を果たすことが考えられる。

以上のように、細胞レベルの実験系ではブルセラ属菌の感染にリピドラフトが関与することが示されたが、個体レベルの感染における役割は依然不明確であった。現在のところブルセラ属菌の感染モデル動物としてはマウスが一般的に用いられている。リピドラフトとブルセラ属菌の感染との関係を調べるために、我々はニーマンピック病 C 型 (NPC) のモデルマウスを用いて検討した⁸⁾。NPC マウスのマクロファージではコレステロールがリソソーム内に蓄積し、ブルセラ属菌感染における細胞表面でのリピドラフトの形成および菌のマクロファージ内増殖は認められない。正常マウスの腹腔内に 10^4 個の菌を接種すると 10 日前後で脾臓内での菌の増殖および脾腫が認められる。一方、NPC マウスでは脾臓内での菌の増殖および脾腫は認められなかった。また、マクロファージ内増殖能を欠く IV 型分泌機構の変異株では菌の脾臓内増殖および脾腫は両マウスとも認められない。これらの結果から、ブルセラ属菌の個体レベルの感染においてもリピドラフトが重要な役割を果たしていることが示された。

リピドラフトの構成分子の一つである GPI アンカー型蛋白質について注目し、ブルセラ属菌のマクロファージ内への侵入時における挙動を検討した。GPI アンカー型蛋白質に特異的に結合する aerolysin を蛍光色素で標識し、これをプローブとして用いて観察したところ、菌がマクロファージ表層を移動する際に、菌から伸びるテール状の GPI アンカー型蛋白質の凝集が観察された (Fig. 4)⁹⁾。一方、GPI アンカー型蛋白質の一つである CD48 あるいは CD55 の抗体を用いて免疫蛍光染色と同様に検討したところ、テール状の凝集は観察されなかった。以上のことから、テール状の凝集には GPI アンカー型蛋白質全てが含まれるのではなく、ある特定の GPI アンカー型蛋白質が含まれる可能性が示唆された。いくつかの GPI アンカー型蛋白質に対する抗体を用いて検討を行ったが良い結果は得られなかった。ところが、GPI アンカー型蛋白質の一つである正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) に対するモノクローナル抗体を用いて検討したところ、菌から伸びるテール状の凝集が観察された。これにより、菌の細胞侵入時に認められる GPI アンカー型蛋白質のテール状の凝集には PrP^C が含まれることが示された。PrP^C ノックアウトマウスを用いて感染実験を行ったところ、PrP^C ノックアウトマ

ウスのマクロファージではブルセラ属菌の細胞侵入時におけるマクロピノソーム形成は認められず、細胞内増殖も阻害された。さらに、PrP^Cノックアウトマウスの脾臓内における菌の増殖も正常マウスに比べ低下することが示された⁹⁾。これにより菌とPrP^Cとの相互作用が菌の細胞内増殖およびマウスへの感染成立に不可欠であることが示された。これはPrP^Cを介したシグナル伝達が増殖型ファゴソーム形成に関与しているものと考えられる。

5. おわりに

細菌を一つの道具として用いることにより、今まで知られていなかったリピドラフトの新たな機能を探索できる可能性がある。また視点を変えると、多くの病原体の感染にリピドラフトが共通に関与することから、リピドラフトを標的とした病原微生物の感染制御法が発見される可能性もある。ある一つの病原体の感染阻止に有効な手法が見出された場合、他の病原体にも応用できるかもしれない。リピドラフトを標的とした薬剤あるいは感染制御物質の開発等が必要である。しかしながら、細菌感染におけるリピドラフトの研究は緒についたばかりで、これらは今後の課題である。

文 献

1) Simons K, Ehehalt R : *J. Clin. Invest.*, **110**, 597-603 (2002)
2) Duncan MJ, Shin JS, Abraham SN : *Cell Microbiol.*, **4**, 783-791 (2002)
3) Clemens DL, Horwitz MA : *J. Exp. Med.*, **175**, 1317-1326 (1992)
4) Vogel JP, Andrews HL, Wong SK, Isberg RR : *Science*,

279, 873-876 (1998)
5) Watarai M, Derre I, Kirby J, et al. : *J. Exp. Med.*, **194**, 1081-1095 (2001)
6) Yoshida S, Goto Y, Mizuguchi K, et al. : *Infect Immun*, **59**, 428-432 (1991)
7) Watarai M, Makino S, Fujii Y, et al. : *Cell Microbiol.*, **4**, 341-355 (2002)
8) Watarai M, Makino S, Michikawa M, et al. : *Infect Immun*, **70**, 4818-4825 (2002)
9) Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, et al. : *J. Exp. Med.*, **198**, 5-17 (2003)
10) Shin JS, Gao Z, Abraham SN : *Science*, **289**, 785-788 (2000)
11) Lafont F, Tran Van Nhieu G, Hanada K, et al. : *EMBO J.*, **21**, 4449-4457 (2002)
12) Watarai M, Funato S, Sasakawa C : *J. Exp. Med.*, **183**, 991-999 (1996)
13) Peyron P, Bordier C, N'Diaye EN, Maridonneau-Parini I : *J. Immunol.*, **165**, 5186-5191 (2000)

(Received 13 June 2006 ;
Accepted 28 July 2006)

著者略歴

度会 雅久 (わたらい まさひさ)
1993年3月 日本獣医畜産大学獣医畜産学部卒業
1997年3月 東京大学大学院医学系研究科修了
1998年10月～2000年9月 米国タフツ大学医学部 博士研究員
1999年4月 帯広畜産大学畜産学部助手
2003年10月 同大学助教授 (現在に至る)