

## 病原細菌がマクロファージによる貪食と殺菌を回避する機構

山本友子

## Bacterial Strategies for Escaping the Bactericidal Mechanisms by Macrophage

Tomoko YAMAMOTO

Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba City 263-8522, Japan

(Received July 27, 2006)

Phagocytosis with macrophages provides a specialized mechanism for regulated ingestion and intracellular destruction of bacteria. Bacteria are first engulfed by endocytosis into a phagosome. The fusion of phagosomes and lysosomes releases toxic products that kill most bacteria and degrade them into fragments. Debris from dead bacteria is then released by exocytosis. However, some bacteria that survive within host phagocytes have evolved strategies to escape the bactericidal mechanisms associated with phagocytosis: i) antiphagocytosis (*Yersinia*), ii) escaping from the phagosome into cytoplasm (*Listeria*), and iii) remodeling their phagosome by inhibiting the maturation of phagosomes (*Salmonella*, *Mycobacterium*, *Legionella*). In this review, I first summarize various strategies by bacteria to avoid phagocytosis by emphasizing the steps that have been subverted by bacteria. Then, I highlight the mechanisms for surviving phagocytosis by *Salmonella*, with a focus on the induction of macrophage-apoptosis and modulation of membrane traffic in host cells.

**Key words**—macrophage; phagocytosis; escape, membrane traffic

## 1. はじめに

マクロファージによる細菌の貪食・殺菌作用は、感染初期に発動される生体側の強力な防御システムである。貪食作用は、食細胞が異物を飲み込み（ファゴサイトーシス）、殺菌除去するまでを含むこともあるが、本稿では、貪食を食細胞によるファゴサイトーシスの意味に限定し、あとの食細胞内殺菌作用と区別して用いる。

マクロファージは細菌を貪食により、内外逆転した細胞膜閉鎖系のファゴソームへと取り込む（Fig. 1(A)）。ファゴソームが形成されるとその膜上で NADPH オキシダーゼの会合と活性化が起こり、酸素 ( $O_2$ ) から活性酸素 ( $\cdot O_2^-$ ) が合成される。同時に vacuolar protein-ATPase の作用によりファゴソーム内の pH が低下すると、活性酸素から過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) やヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) 等の殺菌性の高いラジカルが派生する。通常の非病原

菌は活性酸素により殺菌されてしまうが、病原細菌の多くはスーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼ等のスカベンジャー活性により活性酸素を無毒化してしまう。その後ファゴソームとリソソームが融合し、酸性フォスファターゼ、カテプシン D などの殺菌性蛋白が放出されると多くの細菌は殺菌されてしまう。しかし、この殺菌機構をも回避し、場合によってはマクロファージを住み心地のよい環境に変えてその中で増殖する能力を備えた細菌がいる。このような細菌は細胞内寄生細菌と呼ばれているが、貪食・殺菌からのエスケープ機構は一様ではなく、それぞれ独自の戦略を進化させてきている（Fig. 2）。<sup>1,2)</sup> 例えば第 1 の機構はエルシニアによるものであり、マクロファージの機能を阻害し、貪食に抵抗する。第 2 の機構はリステリアに代表されるものであるが、ファゴソーム膜を溶かして細胞質へ脱出することによりリソソームによる殺菌を回避して増殖する（Fig. 1(B)）。第 3 の機構はサルモネラ、結核菌、レジオネラ、ブルセラ等で報告されているもので、これらの細菌はファゴソームの成熟過程を変化させることによりファゴソームとリソソームとの融合を阻害して生き延び、強力な殺菌作用の

千葉大学大学院薬学研究院微生物薬品化学研究室  
(〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33)

e-mail: tomoko-y@p.chiba-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S5 で発表したものを中心に記述したものである。

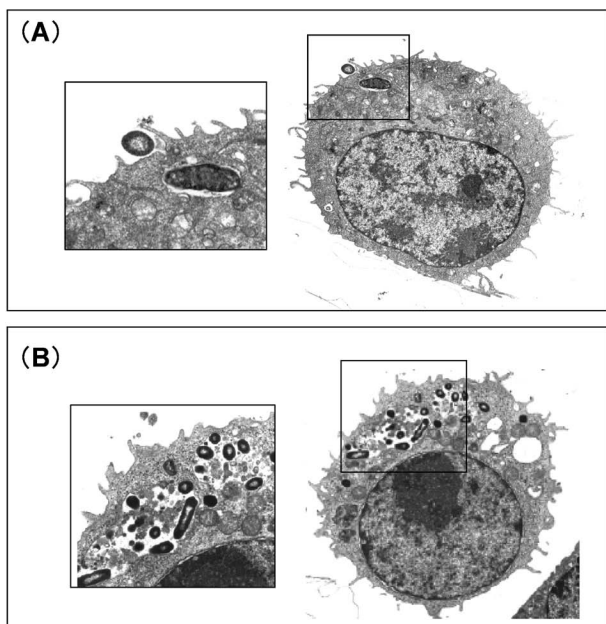


Fig. 1. Intracellular Bacteria (*Listeria monocytogenes*) Phagocytosed by Macrophage

Observations by Electron microscopy were at 10 min (A) and 120 min (B) after infection.

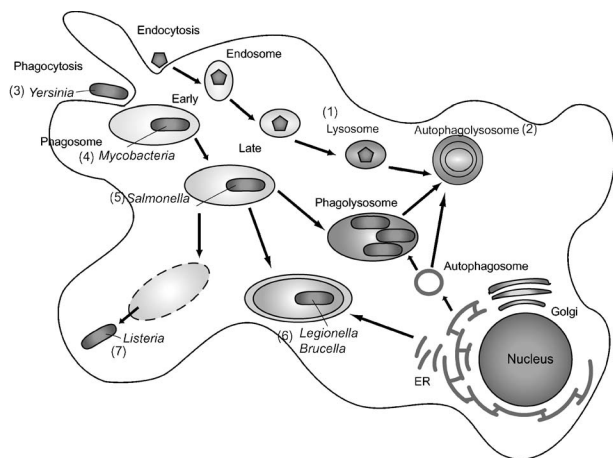


Fig. 2. Bacterial Strategies for Escaping the Bactericidal Mechanisms by Macrophage

Pathogenic bacteria that survive within host phagocytes have evolved mechanisms of survival by remodeling their phagosome (*Salmonella*, *Mycobacterium*, *Legionella*, *Brucella*) or by moving out of the phagosome (*Listeria*). *Yersinia* has evolved an exquisite method for antiphagocytosis.

ないファゴソーム内で増殖することが可能である。さらにある種の病原細菌では、マクロファージのアポトーシスを制御する機能、ファゴリソソームが形成されてもその中の殺菌性物質に抵抗して生き延びる機能も報告されている。本稿では、エルシニア、リステリア、サルモネラのそれぞれ異なるエスケープ機構について、細菌側の分子とマクロファージ側

の高次機能との相互作用に重点をおいて述べる。

## 2. *Yersinia* 属細菌：マクロファージの貪食機能を阻害する (Antiphagocytosis)

エルシニア属細菌でヒトに起病性を有するものは、*Yersinia pestis* (ペスト菌)、*Y. pseudotuberculosis* (仮性結核菌)、*Y. enterocolitica* (腸炎エルシニア) の3菌種である。*Y. pestis* は、ノミに媒介されて皮膚感染し、血流やリンパ系を介して局所リンパ節に入り腺ペストを起こし、さらに肺に運ばれて肺ペストを起こす。肺ペストは経気道感染によっても起こる。一方 *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* は、汚染した食品や水により経口的に取り込まれたのち、腸管から侵入し、パイエル板や腸間膜リンパ節のマクロファージの中で増殖し、腸炎や腸間膜リンパ節炎を引き起こす。*Y. enterocolitica* は食中毒起病菌として指定されている。このようにエルシニア3菌種は感染経路や病態が異なるが、マクロファージ貪食をエスケープする機能は、共通の70 kbpのプラスミドに存在する病原遺伝子群 (Yop virulon) によってもたらされる。YOPは、*Yersinia* outer membrane protein の略である。発見当初は外膜に局在する蛋白質であると考えられてこの名が付いたが、のちに分泌蛋白質であることが分かった。Yop virulonはYopエフェクター蛋白とそれらを細胞内に輸送するタイプIII分泌装置の遺伝子をコードしている。<sup>3)</sup> タイプIII分泌装置は、細菌のペプチドグリカン・内膜・外膜を貫通した蛋白構造体(基部体)に連結して細胞外へ突き出したニードル構造体から構成され、多くのグラム陰性病原細菌に見出されている (Fig. 3)。基部体は蛋白放出のためにチャンネルとして働くと考えられる。ニードルの先端を宿主の標的細胞に刺し、エフェクターと呼ばれる病原蛋白質を注入する。<sup>4,5)</sup> タイプIII分泌装置の構造は細菌鞭毛の根元にある基部体とフック複合体に類似しており、機能的にも共通性があることから鞭毛装置から進化したものと考えられている。

**2-1. YOPによる貪食阻害** エルシニアはマクロファージに貪食されたのち、殺菌機構をエスケープして増殖する細胞内寄生性を有するが、主要なエスケープ機構は貪食そのものに対して抵抗し細胞外で増殖することであると考えられている。この貪食抵抗性は、前述のタイプIII分泌システムを構成するニードルによってマクロファージ細胞へ直

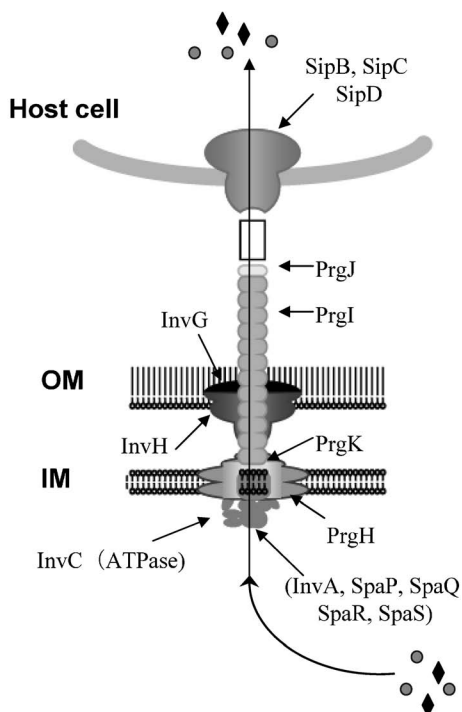


Fig. 3. Schematic Representation of Translocation of Bacterial Proteins into Cytoplasm of Eukaryotic Cells by the Type III Secretion Apparatus

Known positions of established and hypothetical proteins in *Salmonella* type III secretion apparatus are diagrammed. OM: bacterial outer membrane, IM: bacterial inner membrane.

接輸送されエフェクター蛋白の中の YopE, YopT, YopO, YopH によってもたらされる。

食食には、宿主細胞の RhoA, Rac-1, Cdc42 等の Rho family small GTPase に制御されたアクチン重合によるアクチン骨格の再構築が係わっているが、<sup>6)</sup> YopE, YopT, YopO はいずれも small GTPase に作用してアクチン骨格の構築を阻害することによりエルシニアに食食抵抗性を与える。YopE は GAP (GTPase activating protein) として GTP 加水分解を加速させて、Rho family 蛋白を不活性型 (GDP 結合型) にする。<sup>7)</sup> Rho family 蛋白は、COOH 端で細胞質膜にアンカーされているが、YopT は cysteine protease 活性を持って COOH 端近傍を切断することにより GTPase を膜からはずしてしまう。<sup>8)</sup> YopO は autophosphorylating serine-threonine kinase 活性を有し、G-アクチンモノマー、RhoA, Rac-1 に結合する。この結合は食食阻害に関連しているが、詳しいメカニズムは不明である。<sup>9)</sup> YopH は強力な PTPase (protein tyrosine phosphatase) で、focal adhesion 内の focal adhesion kinase (FAK) や

p130Cas を脱リン酸化することにより細胞—細胞間基質の結合を崩壊させる。<sup>10)</sup> Focal adhesion は、インテグリンを介して細胞外マトリックスと細胞骨格 (アクチンフィラメント) が結合する場所であり、細胞内シグナル伝達の起点となる。ここに局在する focal adhesion kinase (FAK) や p130Cas 等は分子内に多くのチロシンリン酸化部位を含んでおり、リン酸化されたペプチドを介して他の分子と結合し、シグナル伝達を仲介する。培養細胞ではシャーレ等器材面への接着として観察され、生体内ではコラーゲン等の細胞外マトリックスとの接着部分と考えられている。以上のように、YOP によってマクロファージ細胞内のシグナル伝達系が攪乱された結果、マクロファージは菌を食食する能力を失うと考えられている。

## 2-2. YOP による炎症反応の抑制とアポトーシスの誘導

YopJ/YopP は、マクロファージによる TNF $\alpha$  の放出と上皮細胞からの IL-8 の放出を減少させて炎症反応を抑制する。この現象は、一連の反応の中心的役割を果たす転写因子 NF- $\kappa$ B 活性化阻害に基づくものであり、阻害カスケードは YopJ/YopP の cysteine protease 活性による IKK $\beta$  の不活性化から始まる。<sup>11)</sup> YopJ/YopP は MKKs (MAPK kinases) 活性を阻害することにより MAPKs (mitogen-activated protein kinases) 経路をブロックして免疫応答関連遺伝子の転写を阻害する。また YopJ/YopP は、細胞質に存在する BID や caspase-3 と caspase-7 の切断を促すことによってマクロファージアポトーシスを惹起する。<sup>12)</sup> このように Yop は免疫システムを妨害することにより、エルシニアの生体内での増殖促進に重要な役割を果たすと考えられる。

## 3. *Listeria* 属細菌：ファゴソーム膜の破壊—細胞質への脱出

リステリア属細菌は広く自然界に分布するが、ヒトに感染を起こす菌種は *Listeria monocytogenes* に限られる。汚染食品により取り込まれた菌は、腸管から侵入して肝臓で増殖して敗血症や髄膜脳炎を引き起こす。妊婦では胎盤感染を起こして流産や死産の原因となる。わが国での発生は少ないが、ヨーロッパ、米国、オーストラリア等の乳製品の消費が高い国では集団発生がみられ、致命率が高いことから恐れられている。

**3-1. 細胞質へのエスケープと増殖** リステリアのエスケープ機構は、ファゴソーム膜に傷害を与えて細胞質へ脱出するものである (Fig. 2). これを可能にするのが染色体上に存在する病原遺伝子群 (*Listeria pathogenicity island-1*: LIPI-1)<sup>13)</sup> にコードされる蛋白質であり、その中心的役割を果たすのが *hly* 遺伝子産物の LLO (*listeriolysin O*) である. LLO は 58 kDa の単純蛋白質で、25 アミノ酸のシグナル配列が切断され 56 kDa の蛋白質として分泌される. *hly* は SLO (*streptolysin: Streptococcus pyogenes* の溶血素) や PFO (*perfringolysin O: Clostridium perfringens* の溶血素) 等の各種グラム陽性菌が産生するコレステロール依存性膜傷害蛋白質 CDTX (*cholesterol-dependent pore-forming toxin*) の遺伝子と相同性が高い.<sup>14)</sup> CDTX は一般に細胞膜コレステロールに結合してオリゴマーとなり、径 20—30 nm の膜貫通性孔を形成して傷害することから、リステリアは LLO によりファゴソーム膜に無数の孔を開け、細胞質へ脱出すると考えられる.

**3-2. オートファジーの回避** ファゴソームから脱出したリステリアは殺菌を免れて細胞質で増殖することができるが、細胞質として菌にとってかならずしも安全ではない. 真核細胞は自己成分の消化のためにオートファジーと呼ばれる細胞内蛋白質分解系を有している.<sup>15)</sup> 最近、哺乳動物細胞がオートファジーを活用して細胞質に侵入した病原細菌を感知し、除去を行うことが明らかにされた.<sup>16)</sup> さらに細胞質で増殖する *Listeria*<sup>17)</sup> や赤痢菌<sup>18)</sup> はオートファジーを逃れる機能を持っているという発見が相次いでなされた.

**3-3. 細胞質内移動と細胞間感染拡大** リステリアは 4 本の鞭毛によって運動することができるが、鞭毛の発現は 37°C では抑制されるため、宿主細胞質内では菌自身で移動することができない. そこでリステリアは LIPI-1 に存在する *actA* 遺伝子の産物 ActA を使って宿主の F-アクチン重合を促進させ、これを推力として移動を可能にしている. ActA は菌体の端に極性を持って発現され、その C 末端の疎水性配列で菌体にアンカーされている. N 末端にはアクチンや Arp2/3 への結合に必須な配列が、中間には宿主の VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*) やプロフィリン (*profilin*: アクチン結合蛋白質) と結合する部位がある. これらを

活性化してアクチンの重合が起こり、Arp2/3 がアクチンフィラメントをクロスリンクすることにより菌体端にいわゆるコメットテイルが形成される. その重合、脱重合が菌体近傍で繰り返されることによって菌は推進力を得、細胞内を動くことが推定されている.<sup>19)</sup> 細胞内を移動した菌は細胞二重膜を破って隣接細胞へ貫入して感染を拡大することができる. これを可能にする遺伝子は LIPI-1 に存在する *plcB* (レシチナーゼ遺伝子), *mpl* (Zn-メタロプロテアーゼ遺伝子) 等である. Zn-メタロプロテアーゼや宿主システインプロテアーゼによって Pro-PlcB が活性化されレシチナーゼのリン脂質基質域の広い膜傷害性が発揮されて細胞二重膜を破り、隣接細胞へと感染を拡大すると考えられている.<sup>20)</sup>

#### 4. サルモネラ属細菌：ファゴソームのリモデリングと細胞内増殖

サルモネラ属細菌は、急性食中毒の原因菌 (例: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *S. enterica* serovar Typhimurium) やチフス症の原因菌 (*S. enterica* serovar Typhi 及び *S. enterica* serovar Paratyphi) 等を含む 2000 種類を超す膨大な菌種・血清型群の総称である. チフス症は開発途上国を中心に現在でも年間 1600 万人が発症し、60 万人の死亡が報告される重要な感染症の 1 つである. わが国では昭和初期から終戦直後までは、年間、数万の発症がみられたが、衛生水準の向上とともに発症数は減少した. 1990 年代以降は年間 100 件程度の発症であるが、そのほとんどが海外からの輸入感染である. 非チフス性サルモネラ症は世界的に最も多い食中毒であり、患者数は年間 1 億 3000 万人に上ると言われている.

汚染された食物や飲料水により摂取された菌は、小腸粘膜上皮細胞やパイエル板の M 細胞を使って組織に侵入する. その後、直下のマクロファージに貪食されるが、マクロファージ殺菌機構をエスケープして細胞内で増殖する. ほとんどの血清型サルモネラは、腸間膜リンパ節のマクロファージで増殖し、そこに留まり腸炎を起こすが、チフス菌はマクロファージに包まれたままリンパ管を経て血中に入り、肝臓や脾臓に伝播し、さらに組織のマクロファージ内で増殖して重篤な全身感染症 (チフス症) を引き起こす. 現在までにサルモネラには病原性に係わる 10 個の病原遺伝子群 (*Salmonella pathogen-*

icity island: SPI) が見出されているが,<sup>21)</sup> その中でマクロファージ殺菌機構からのエスケープに係わる遺伝子は主に SPI2 (39.7 kbp) にコードされている。<sup>22)</sup> 一方 SPI1 (39.8 kbp) 上の病原遺伝子は上皮細胞からの侵入とマクロファージのアポトーシス誘導に関与する。<sup>23,24)</sup> SPI1 と SPI2 それぞれにコードされる特異的なタイプ III 蛋白分泌システム (Fig. 3) によって標的細胞にエフェクター蛋白を注入し、細胞機能を攪乱して病原性を発揮する。

**4-1. メンブランチラフィック障害** サルモネラは貪食されたのち、ファゴソームの成熟過程を変化させ、ファゴソーム・リソソーム融合を阻害し、ファゴソームをリモデリングして、その中で増殖することが可能である。サルモネラはマクロファージ内で SCV (*Salmonella*-containing vacuole) と呼ばれる小胞に包まれて存在している (Fig. 4)。

通常の細菌を取り込んだファゴソームは、エンドソームとの一連の融合を経て成熟し、最終的にリソソームと融合して菌を消化する (Fig. 5(A))。まず初期エンドソームと融合して、Rab5 (膜局在性の低分子量 GTPase で、細胞内での小胞の行き先を決定する蛋白質) や Transferrin receptor (TR: 鉄原子結合蛋白質 Transferrin の受容体) を獲得する。さらに、TransGolgi Network 由来の酵素を含む後期エンドソームとの融合により Rab7, M6PR (mannose 6-phosphate receptor protein), Lgp (lysosomal glycoprotein) 等の分子を獲得するが、その一方で Rab5 を失う。その後、カテプシンなどの加水分解酵素や vacuole の酸性化に関与する vATPase を含

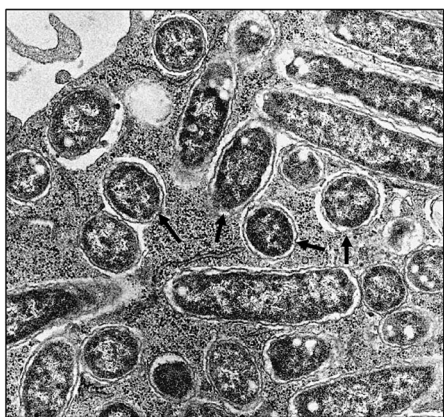


Fig. 4. *Salmonella*-containing Vacuoles in Macrophages

Vacuolar membranes (arrows) are closely associated with the majority of bacterial cells.

むリソソームと融合し、その中で菌が消化される。この過程は、メンブランチラフィック (小胞等の膜構造体が分裂や融合を繰り返すことにより、内包される各種の蛋白分子が細胞内を移動する機構) と呼ばれている。<sup>25,26)</sup>

貪食直後のサルモネラを内包する SCV は、Rab5 と TR を獲得していることから初期エンドソームとの融合は正常に起きていると思われる (Fig. 5 (B))。その後 SCV は Lgp を獲得するが、Rab7 や M6PR は見出されないことから、early SCV が形成されたのち、メンブランチラフィックは進行するが後期エンドソームへの成熟は不完全に終わっていると思われる。<sup>27,28)</sup> このようにして形成された Intermediate SCV はリソソームと融合することができず、結果として SCV 内のサルモネラは殺菌を逃れることができる。これらの過程には SPI2 エフェクター蛋白が必要であるが、まだ十分には解明されて

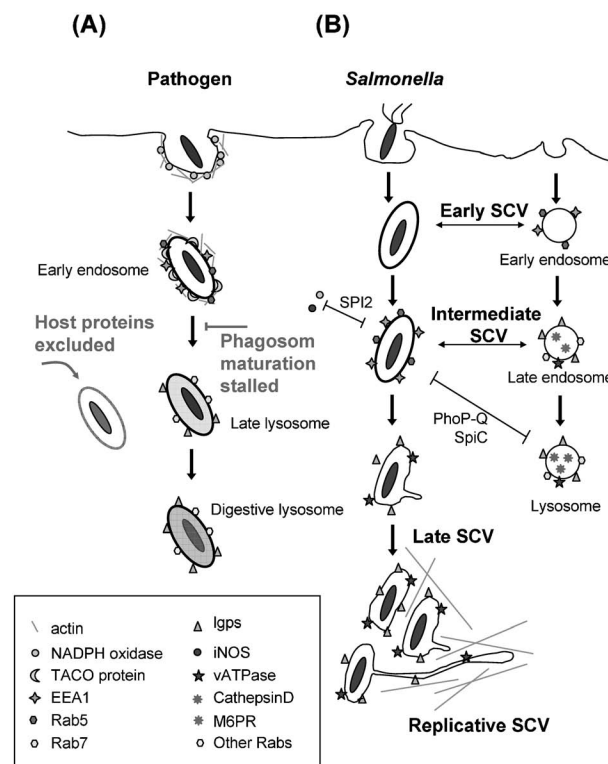


Fig. 5. Proposed Model of Trafficking of the *Salmonella* Vacuole in Macrophages

(A) Membrane trafficking after phagocytosis of pathogen. (B) Maturation step of the *Salmonella*-containing vacuole (SCV). After internalization, the bacterium is found in a nascent SCV interacting with early endosomes, acquiring EEA1 and the transferring receptor (TFR). Then, the SCV matures to an intermediate stage characterized by the accumulation of Lgps/rab7-vesicles likely arising from late endosomes. This leads to the formation of a mature SCV in which the bacterium starts to replicate. Replication is concomitant with the formation of *Salmonella*-induced filaments (Sifs).

いない。エフェクターの1つ SpiC 欠損株はマクロファージ内で増殖不能となる。<sup>29)</sup> SpiC は正常なメンブランチラフィックに必要な宿主の因子を阻害してファゴソームの成熟を妨げていると考えられている。SpiC の宿主側標的分子として機能未知蛋白 TassC が同定されたことから、SpiC は TassC が SCV に輸送されるのを阻害することにより、SCV リモデリングに係わっている可能性が考えられている。<sup>30)</sup> SPI2 変異株を内包する SCV には、NADPH oxidase や iNOS が集積してくることから、SPI2 には SCV 内の活性酸素や活性窒素産生を抑制する機能を有していると考えられる。<sup>31)</sup>

感染3時間から4時間後になると、サルモネラは Sif (*Salmonella*-induced filament) と名付けられた管状の膜構造体を SCV に誘導する<sup>32)</sup> (Fig. 5 (B))。Sif の形成とともにサルモネラは SCV 内での増殖を開始する。Sif の形成には Rab7 とサルモネラ側の因子 SifA が必要である。SifA は SPI2 にはコードされていないが、SPI2 のタイプ III 蛋白分泌装置によって宿主へ輸送される。Sif は上皮細胞でも形成される。サルモネラが上皮細胞に侵入すると数時間後に、SCV 近傍に F-アクチンのネットワークが誘発される。重合したアクチンは、filamin により架橋され、profilin が結合したアクチンモノマーによってその重合は促進され、SCV 膜の融合、SCV の細胞内移動に関与することが示唆されている。

**4-2. マクロファージアポトーシス誘発** 感染初期の SPI2 機能が十分に発現しない段階では、サルモネラはマクロファージにアポトーシスを誘発してその殺菌機構から逃れ感染を拡大する。この初期アポトーシス誘発に係わる菌側の因子は SPI1 にコードされる SipB 蛋白であり、宿主側因子は Caspase (cysteine protease) ファミリーの Caspase-1 である。<sup>33)</sup> SipB は proCaspase-1 に直接結合し、これを活性化する。Caspase-1 ノックアウトマウスを経口感染させると、サルモネラはパイエル板に一時的に感染するが、その後腸間膜リンパ節や脾臓などへ伝播されず全身感染は起こらない。しかしながら腹腔より感染させると全身感染が起きることから、Caspase-1 はサルモネラのパイエル板から全身への伝播に必要であると考えられる。<sup>34)</sup> 真核細胞には少なくとも 14 種類の Caspase が見出されているが、それらの中で細胞死をもたらす中心的な実行因子は

Caspase-3 である。これまでサルモネラ感染によるアポトーシスの誘導に Caspase-3 の関与はないとされてきたが、最近われわれは、マクロファージ内で SPI1 遺伝子発現が脱抑制されると Caspase-3 が増加し、過剰なアポトーシス誘導が起こることを見出した。<sup>35)</sup> サルモネラが感染初期に、マクロファージをアポトーシスにより殺すことは感染拡大に不可欠であるとしても、マクロファージはサルモネラの増殖の場としても重要な細胞であるから、アポトーシスの誘導は菌自身によって厳密に制御されていると考えられる。<sup>21)</sup>

**4-3. サルモネラの病原性発現制御機構** サルモネラは、感染の各段階で遭遇する環境の変化や生体防御機構の発動に対応して、腸管上皮細胞やマクロファージ食菌抵抗性・細胞内増殖等の病原戦略の発現を巧みにコントロールしている。高浸透圧や低酸素条件で培養したサルモネラは SPI1 遺伝子発現が亢進し、小腸上皮細胞への侵入率も増加する。一方、酸性条件下、低 Mg<sup>2+</sup>、低リン酸濃度条件では SPI2 遺伝子の発現が誘導される。このことから、SPI1 は腸管組織で、SPI2 はマクロファージ内で主に発現されると考えられる。<sup>36)</sup> 病原遺伝子の発現制御には SPI 内外の様々な遺伝因子が関与している。われわれは病原細菌が感染後に遭遇する環境の急激な変化や生体防御機構の発動がシグナルとなって細菌のストレス蛋白質が誘発され、それらが病原性発現に深く係わることを明らかにしてきた。<sup>37-39)</sup> ストレス蛋白質は機能面から分子シャペロンとプロテアーゼに大別されている。ここでは最近明らかにした Lon プロテアーゼと ClpXP プロテアーゼによるサルモネラ病原性発現制御機構について紹介する。

**4-3-1. Lon プロテアーゼによる SPI1 と SPI2 の制御** 細胞の蛋白質分解には、大きく2つの意義がある。1つは損傷を受けた蛋白質を分解してアミノ酸という部品を回収するいわゆる蛋白質のリサイクリングシステムとしての役割である。もう1つは遺伝子発現や蛋白の機能発現を調節する特定の生理的基質蛋白質を分解することにより、その蛋白質の細胞内量を厳密に決定する細胞活動のコントロールシステムとしての役割である。細菌の細胞内蛋白質分解の 90% 以上は4種の ATP 依存型プロテアーゼ、すなわち ClpAP, ClpXP, HslIVU を含む Clp プロテアーゼ群と Lon プロテアーゼにより担われて

いる。<sup>40)</sup> われわれはサルモネラの Lon を欠損させると上皮細胞への侵入効率が著しく増加することを見出し、Lon が SPI1 発現の負の強力なレギュレーターであることを明らかにした。<sup>41)</sup> SPI1 遺伝子群の発現には、4 つの転写因子 HilC, HilD, HilA, InvF が階層性を持って係わっている (Fig. 6)。まず HilC, HilD が *hilA* プロモーターの上流に結合して転写開始を誘導する。HilA は *invF* を含むすべての SPI1 遺伝子の転写促進因子として働く。さらに InvF は SPI1 内外の effector 遺伝子の転写を活性化する。現時点では、HilC, HilD が SPI1 転写階層の頂点に存在すると考えられているが、われわれは、Lon が HilC, HilD を直接認識し分解することによりその生理的濃度を決定し、SPI1 発現と細胞侵入効率を厳密に制御していることを明らかにした。<sup>42)</sup>

さらにわれわれはサルモネラはマクロファージに貪食されると直ちに SPI1 発現を停止させ、自らの住処であるマクロファージがアポトーシスに陥るのを防ぐが、Lon 欠損株は貪食されたのちにも SPI1

を連続的に発現して高頻度にアポトーシスを引き起こすことを明らかにした。<sup>35)</sup> 一方 Lon 欠損により SPI2 蛋白質の産生は強く抑制された (未発表データ)。したがって、Lon は SPI1 発現を負に SPI2 の量を正に調節することにより、感染の種々の段階でサルモネラによる病原戦略発動の時間的・空間的制御を可能にしていると言える。Lon 欠損株はマウスに対する病原性が低下していることからサルモネラの病原性発現には不可欠な因子であると言える。<sup>37)</sup>

**4-3-2. ClpXP プロテアーゼによるタイプ III 分泌システム発現の共役調節** 前述のように細菌の鞭毛装置は構造と機能の共通性から、タイプ III 蛋白質分泌装置のプロトタイプと考えられている。細菌の鞭毛形成と機能発現には 50 を超す遺伝子が直接関与するが、レギュロン全体はわずか 3 つの転写階層からなるカスケードである (Fig. 6)。階層の頂点に位置するのは、*flhD*, *flhC* 遺伝子であり、それぞれの遺伝子産物が FlhC<sub>2</sub>FlhD<sub>2</sub> ヘテロテトラマー

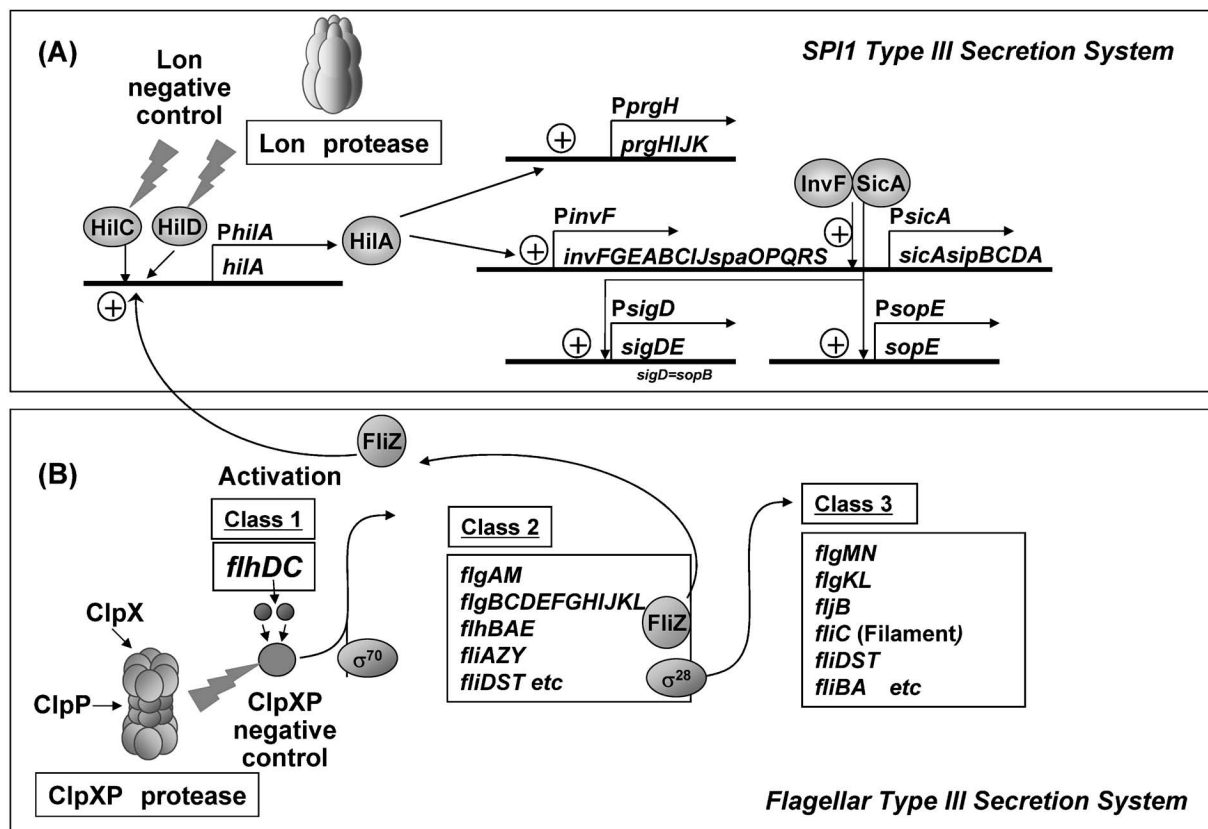


Fig. 6. Regulatory Mechanisms of Expression of Genes for SPI1- and Flagellum-type III Secretion Systems by Lon and ClpXP Proteases

(A) Lon recognizes and degrades HilC and HilD proteins, leading to downregulation of SPI1 gene expression. (B) ClpXP recognizes and degrades FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> transcriptional regulators, leading to downregulation of flagellar gene expression. FliZ is known to activate the expression of SPI1 regulon.

に会合してレギュロン全体の転写誘導を可能にする。われわれは、サルモネラの ClpXP 欠損株が鞭毛を過剰に形成することを見出した。<sup>43)</sup> さらに過剰形成の原因を検討し、ClpXP が FlhC<sub>2</sub>FlhD<sub>2</sub> 複合体のターンオーバーに係わることにより鞭毛レギュロンの発現を負に調節することを明らかにした。<sup>44)</sup> 鞭毛レギュロンのクラス 2 にコードされる FlhZ は、鞭毛形成における役割は不明であるが、前述の SPI1 の転写促進因子 HilA の転写を活性化することから、ClpXP は鞭毛レギュロンを経由して SPI1 発現を制御していると考えられる。一方、ClpXP 欠損株では SPI2 蛋白レベルが顕著に抑制された(未発表データ)ことから、SPI1 と SPI2 の量的調節に係わる因子であると言える。また ClpXP 欠損株はマウスに対する病原性が低下することから病原性発現に必須な因子である。<sup>39)</sup>

Lon や ClpXP はマクロファージ内の殺菌機構に対応して誘導されるストレス蛋白質であり、<sup>45,46)</sup> SPI1 発現を抑制し、SPI2 量を増加させる制御因子として働くことが明らかとなった。このような遺伝子発現の正と負の共役的調節は、サルモネラの病原戦略のコントロールシステムとして大きな意義を有している。すなわち、前述のようにサルモネラは、感染初期に SPI1 エフェクターの作用によりマクロファージにアポトーシスを起こしながら感染を拡大するが、マクロファージはサルモネラの増殖の場として必要な細胞であることから、アポトーシスの誘導を適切なレベルに抑え、同時に細胞内増殖を可能にする SPI2 の発現を促すことが必要である。Lon や ClpXP プロテアーゼによる SPI1 と SPI2 発現の共役的調節は、この目的にあった巧妙な戦略であると言える。

## 5. おわりに

感染は病原体と宿主の攻防戦である。一見どちらかが優勢にみえても実は相互に攻略を図っているようである。細胞内寄生細菌が宿主の生体防御の第一線で活躍するマクロファージの殺菌機構を巧妙にエスケープし、さらにはマクロファージを安全な住処にリモデリングして増殖し、一方では宿主の免疫機構をブロックする作戦を展開する等、その複雑なシステムが、細菌側の分子と宿主側の高次機能との相互作用のレベルで理解できるようになってきた。生体防御機構と細胞内寄生細菌のエスケープ機構は、

宿主と病原体が長い年月をかけて相互に攻めあい凌ぎあってその戦略を進化させてきた結果であると考えられる。

## REFERENCES

- 1) Schaible U. E., Kaufmann S. H. E., *Nat. Rev.*, **2**, 946–953 (2004).
- 2) Schaible U. E., Kaufmann S. H. E., *Trends Microbiol.*, **13**, 373–380 (2005).
- 3) Bleves S., Cornelis G. R., *Microb. Infect.*, **2**, 1451–1460 (2000).
- 4) Hueck C. J., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 379–433 (1998).
- 5) Buttner D., Bonas U., *Trends Microbiol.*, **10**, 186–192 (2002).
- 6) Cornelis G. R., *J. Cell Biol.*, **158**, 401–408 (2002).
- 7) Black D. S., Blaska J. B., *Mol. Microbiol.*, **37**, 515–527 (2000).
- 8) Shao F., Merritt P. M., Bao Z., Innes R. W., Dixon J. E., *Cell*, **109**, 575–588 (2002).
- 9) Galyov E. E., Hakansson S., Forsberg A., Wolf-Watz H., *Nature*, **361**, 730–732 (1993).
- 10) Hamid N., Gustavsson A., Andersson K., McGee K., Persson C., Rudd C. E., Fallman M., *Microb. Pathog.*, **27**, 231–242 (1999).
- 11) Orth K., Palmer L. E., Bao Z. Q., Stewart S., Rudolph A. E., Bliska J. B., Dixon J. E., *Science*, **285**, 1920–1923 (1999).
- 12) Denecker G., Declercq W., Geuijen C. A., Boland A., Benabdillah R., van Gurp M., Sory M. P., Vandenabeele P., Cornelis G. R., *J. Biol. Chem.*, **276**, 19706–19714 (2001).
- 13) Vazquez-Boland J. A., Dominguez-Bernal G., Gonzalez-Zorn B., Kreft J., Goebel W., *Microb. Infect.*, **3**, 571–584 (2001).
- 14) Gaillard J. L., Berche P., Sansonetti P., *Infect. Immun.*, **52**, 50–55 (1986).
- 15) Yoshimori T., *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **46**, 2117–2126 (2001).
- 16) Nakagawa I., Amano A., Mizushima N., Yamamoto A., Yamaguchi H., Kamimoto T., Nara A., Funao J., Nakata M., Tsuda K., Hamada S., Yoshimori T., *Science*, **306**, 1037–1040 (2004).
- 17) Rich K. A., Burkett C., Webster P., *Cell. Microbiol.*, **5**, 455–468 (2003).
- 18) Ogawa M., Yoshimori T., Suzuki T., Sagara



- H., Mizushima N., Sasakawa C., *Science*, **307**, 727–731 (2004).
- 19) Cossart P., Lecuit M., *EMBO J.*, **17**, 3797–3808 (1998).
- 20) Grundling A., Gonzalez M. D., Higgins D. E., *J. Bacteriol.*, **185**, 6295–6307 (2003).
- 21) Yamamoto T., Takaya A., *Nippon Saikingaku Zasshi*, **60**, 375–387 (2005).
- 22) Waterman S. R., Holden D., *Cell. Microbiol.*, **5**, 501–511 (2003).
- 23) Kondler L. A., Finlay B. B., *Microb. Infect.*, **3**, 1321–1326 (2001).
- 24) Galan J. E., Zhou D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 8754–8761 (2000).
- 25) Knodler L. A., Steele-Mortimer O., *Traffic*, **4**, 587–599 (2003).
- 26) Brumell J. H., Grinstein S., *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 78–84 (2004).
- 27) Garcia-del Portillo F., Finlay B. B., *J. Cell Biol.*, **129**, 81–97 (1995).
- 28) Hashim S., Mukherjee K., Raje M., Basu S. K., Mukhopadhyay A., *J. Biol. Chem.*, **275**, 16281–16288 (2000).
- 29) Uchiya K., Barbieri M. A., Funato K., Shah A. H., Stahl P. D., Groisman E. A., *EMBO J.*, **18**, 3294–3933 (1999).
- 30) Lee A. H., Zareei M. P., Daefler S., *Cell. Microbiol.*, **4**, 739–750 (2002).
- 31) Gallois A., Klein J. R., Allen L. A., Jones B. D., Nauseef W. M., *J. Immunol.*, **166**, 5741–5748 (2001).
- 32) Stein M. A., Leung K. Y., Zwick M., Garcia-del Portillo F., Finlay B. B., *Mol. Microbiol.*, **20**, 151–164 (1996).
- 33) Hersh D., Monack D. M., Smith M. R., Ghori N., Falkow S., Zychlinsky A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 2396–2401 (1999).
- 34) Monack D. M., Hersh D., Ghori N., Bouley D., Zychlinsky A., Falkow S., *J. Exp. Med.*, **192**, 249–258 (2000).
- 35) Takaya A., Suzuki A., Kikuchi Y., Eguchi M., Isogai E., Tomoyasu T., Yamamoto T., *Cell. Microbiol.*, **7**, 79–90 (2005).
- 36) Hansen-Wester I., Hensel M., *Microbes Infectes.*, **3**, 549–559 (2001).
- 37) Takaya A., Suzuki M., Matsui M., Tomoyasu T., Sashinami H., Nakane A., Yamamoto T., *Infect. Immun.*, **71**, 690–696 (2003).
- 38) Takaya A., Tomoyasu T., Matsui H., Yamamoto T., *Infect. Immun.*, **72**, 1364–1373 (2004).
- 39) Yamamoto T., Sashinami H., Takaya A., Tomoyasu T., Matsui H., Hanawa T., Kamiya S., Nakane A., *Infect. Immun.*, **69**, 3164–3174 (2001).
- 40) Gottesman S., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 565–587 (2003).
- 41) Takaya A., Tomoyasu T., Tokumitsu A., Morioka M., Yamamoto T., *J. Bacteriol.*, **184**, 224–232 (2002).
- 42) Takaya A., Kubota Y., Isogai E., Yamamoto T., *Mol. Microbiol.*, **56**, 839–852 (2005).
- 43) Tomoyasu T., Ohkishi T., Ukyo Y., Tokumitsu A., Takaya A., Suzuki M., Sekiya K., Matsui H., Kutsukake K., Yamamoto T., *J. Bacteriol.*, **184**, 645–653 (2002).
- 44) Tomoyasu T., Takaya A., Isogai E., Yamamoto T., *Mol. Microbiol.*, **48**, 443–453 (2003).
- 45) Buchmeier N. A., Heffron F., *Science*, **248**, 730–732 (1990).
- 46) Takaya A., *Nippon Saikingaku Zasshi*, **61**, 243–250 (2006).