

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18782

研究課題名(和文)環境細菌の新規病原性獲得における原生生物の関与についての解析

研究課題名(英文)A study on the contribution of symbiosis between Legionella and protists to their pathogenicity

研究代表者

渡邊 健太(WATANABE, KENTA)

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号：20582208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：環境中で生存するレジオネラとその宿主である原生生物との共生関係を明らかにすることを目的に研究を行った。ゾウリムシを共生宿主とした解析により、レジオネラが持つ共生に必須な因子を複数同定した。また、レジオネラは特定の因子を用いることで原生生物との共生関係を維持あるいは解消し、生存戦略の一端として利用していることが示唆された。以上の結果は、レジオネラの生態解明に大きく貢献するものであり、環境中でのレジオネラの拡散防止法の開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The symbiotic relationship between Legionella and protists in the environment has a huge impact when considering the infectious risk in humans. In this study, I established a novel natural host model of *L. pneumophila* endosymbiosis using the ciliate *Paramecium caudatum*. Using this model, I identified 5 candidate genes related to symbiosis between *L. pneumophila* and *P. caudatum*. I also identified Legionella endosymbiosis-modulating factor A (LefA), which contributes to the change in life stage from endosymbiosis to host lysis, enabling escape to the environment. An isogenic *L. pneumophila* *lefA* mutant exhibited decreased cytotoxicity toward *P. caudatum* and impaired the modification of LCVs, resulting in the establishment of endosymbiosis between them. These results suggest that *L. pneumophila* may have a mechanism to switch their endosymbiosis in protistan hosts in the environment. This study may provide novel Legionella infection control methods based on inhibiting their symbiosis.

研究分野：細菌学

キーワード：レジオネラ ゾウリムシ 共生 細胞内寄生 原生生物 ホロスポラ

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトや動物に病気を引き起こす病原細菌が持つ病原因子の一つに、細胞内寄生性が挙げられる。その分子メカニズムについては未だ解明されていない部分も多い。レジオネラ属菌は細胞内寄生性を有する病原細菌の一つであり、ヒトに感染すると肺胞マクロファージ内で増殖し、肺炎を主としたレジオネラ症を引き起こす。このレジオネラ属菌を対象とした研究は世界中で広く行われているが、その多くはマクロファージなどの哺乳類培養細胞を用いた感染実験を基盤とした解析が中心である。レジオネラ属菌は、こうした哺乳類細胞に感染すると「エフェクター」と呼ばれる分泌タンパク質を直接宿主細胞内に輸送する。エフェクターは宿主細胞側の様々な因子と相互作用することで機能を発揮し、菌の細胞内増殖を可能にしている。現在までに、レジオネラ属菌は全タンパク質の1割近い約300個のタンパク質がエフェクターとして宿主細胞内へ輸送されると想定されている。しかしながら、この膨大な数のエフェクターが個々にどのような機能を持ち、菌の細胞内増殖や病原性にどの程度関与しているのかについては、部分的にしか明らかになっていない。遺伝子操作により欠損させても細胞内増殖や病原性に影響が無く、その存在意義が不明なエフェクターも多く存在する。さらに、レジオネラ属菌は基本的にヒトからヒトへの感染が成立せず、菌にとってヒトは最終宿主であることを踏まえると、ヒトに感染した後に、その体内でヒトへの病原性を獲得・進化させた可能性は極めて低いと考えられる。以上のことから、レジオネラ属菌の病原性や感染源の全貌を明らかにするためには、既存のアプローチとは異なった解析方法の確立が必須である。

こうした問題に対する答えの一つとして、環境中でのレジオネラ属菌と原生生物の関係性が重要な意味を持つ可能性が考えられる。レジオネラ属菌は淡水や土壌といった自然環境中に普遍的に存在しており、そこで原生生物内に寄生していることが知られている。また、これまで分子進化の系統解析においては、レジオネラ属菌は偏性細胞内寄生菌であるQ熱の病原体(*Coxiella burnetii*)と近接している関係にあり、生態進化において他の真核生物への寄生・共生の方向性に進んできたグループに属することも強く示唆されている。すなわち、レジオネラ属菌は進化の過程において原生生物との相互作用を繰り返し、その結果、原生生物内での生存・増殖を可能にするメカニズムを獲得したと推察できる。さらに、このメカニズムを応用させることによりヒト肺胞マクロファージ内で増殖し、結果として肺炎を引き起こしていると考えられる。

現在ヒトで致死的な肺炎を起こすレジオネラ症の原因の8割以上は *Legionella pneumophila* に集中しているが、一方でヒト

に病原性を示さないレジオネラ属菌も多く存在することがわかっている。そうした非病原性レジオネラ属菌や、あるいは分類の全く異なる環境細菌が哺乳類細胞内環境に適応するシステムを獲得することで、その感染リスクや病原性が変化し、将来的にヒトや動物への脅威となる高病原性細菌として感染が拡大する可能性は否定できない。

## 2. 研究の目的

以上の背景から本研究では、環境中から分離したレジオネラ属菌を用いることで、原生生物内寄生という現象が菌の病原性獲得においてどのような意義があるのかを解析する。本研究によって明らかにするレジオネラ属菌を含む環境細菌の原生生物内寄生メカニズムと病原性に関する知見を応用させることで、新たな病原細菌出現に対する予防的な対策方法を構築することが可能であると考えた。

## 3. 研究の方法

本研究では、レジオネラ属菌とその原生生物宿主としてゾウリムシを用いた実験系により解析を行った。

### (1) ゾウリムシ感染モデルの構築

レジオネラ属菌は、購入可能な株を国内外から入手し、加えて自然環境中からも分離することで複数の性状が異なる株を得た。またゾウリムシについては、ナショナルバイオリソースプロジェクト(ゾウリムシ拠点; 山口大学)が存在することから、これを利用して複数の株を取得した。これらを材料として、感染条件や株間の組合せを検討し、最適な感染モデル系を構築した。

### (2) ゾウリムシとの細胞内寄生を成立させている因子・メカニズムの同定

(1)により構築したレジオネラ属菌-ゾウリムシ感染モデルを用いることで、実際に菌が原生生物の細胞内に留まり、そこで生存・増殖するメカニズムの解析を行った。原生生物宿主との関係性の維持に関与すると思われる候補遺伝子については欠損株を作成し、再度ゾウリムシでの感染実験によりその機能を解析した。

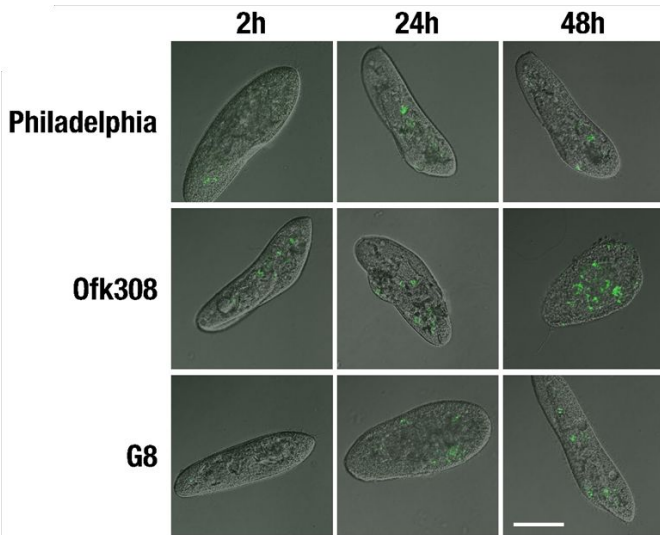
### (3) 哺乳類マクロファージ細胞を用いた感染実験による解析

(2)で作成した欠損株を哺乳類細胞に感染させ、原生生物における細胞内寄生性とヒトなどの細胞内での寄生性や病原性との比較解析を行う。マクロファージ内増殖に関与するレジオネラ属菌の因子としてはDot/Icm系が既に同定されており、解析が進んでいるが、このDot/Icmには依存しない原生生物での細胞内寄生に関与する新しい因子・メカニズムの同定を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) ゾウリムシを用いたレジオネラ感染モデルの構築

様々なレジオネラ菌株とゾウリムシ株の組合せ、あるいは感染条件の検討を行った結果、レジオネラ属菌は餌となる大腸菌などとは異なり、消化・排泄されることなく、多くの株が食胞内で長期間生存し細胞内共生が成立した。しかし、一部の株はゾウリムシに対して細胞毒性を示し、これを殺して再び細胞外に脱出する現象が認められた。すなわち、レジオネラとゾウリムシの間には、安定的な共生関係以外にも複数の関係性が存在することが示唆された(図1)。また、共生関係が成立する場合においては、菌を含む食胞の酸性化は抑制されていなかった。ゾウリムシ感染時においてレジオネラ属菌は、マクロファージなどの哺乳類細胞に感染した場合とは全く異なるメカニズムで食胞内に留まることがわかった。さらに、環境中から分離したレジオネラ株間では保有しているプラスミドの種類や数が大きく異なっており、これらプラスミド上の因子がゾウリムシとの共生の成立や細胞毒性に関与している可能性も示唆されたが、詳細は明らかにすることができなかった。



【図1 レジオネラを感染させたゾウリムシ】

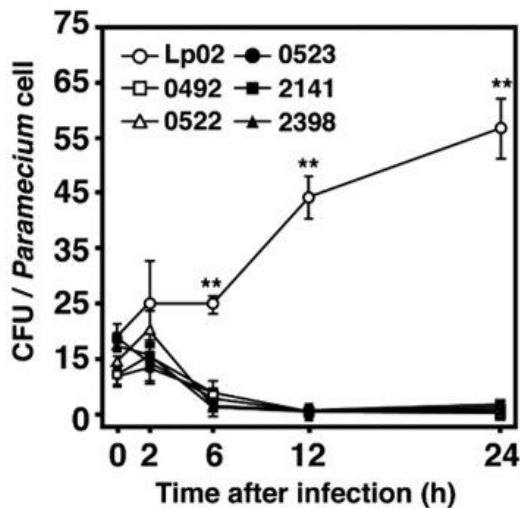
##### (2) ゾウリムシに対する細胞傷害性に関与する因子・メカニズムの同定

(1)の結果より、ゾウリムシに対して傷害性を示した野外分離株 Ofk308 を親株とし、トランスポゾンを用いたランダム muta-tion の手法により複数の遺伝子変異株を作出した。その中から、ゾウリムシへの傷害性が消失した変異株を選別し、その変異が入った遺伝子の同定を試みたところ、菌のアミノ酸輸送に関連する *lefA* 遺伝子が候補と

して挙げられた。*lefA* の欠損株 (G8 株) はゾウリムシに対する傷害性が消失し、細胞内での共生が成立した(図1)。ゾウリムシでの共生が成立するレジオネラ株としない株の間で、*LefA* のアミノ酸配列に特異的な差異は認められなかったことから、*lefA* の発現を Real-time PCR により定量し、比較検討した。結果、試験管培養時には有意な差は認められなかったのに対し、ゾウリムシに感染させることで、Ofk308 において発現の顕著な上昇が認められた。また、Ofk308 を感染させた場合にのみゾウリムシ食胞の酸性化は抑制されており、食胞が巨大化する現象も認められた。以上の結果より、*lefA* はゾウリムシ食胞のトラフィッキングのコントロールに関与しており、レジオネラ属菌は *lefA* の発現量を調整することで共生の可否を決めている可能性が示唆された。

##### (3) ゾウリムシとの共生に関与する因子・メカニズムの同定

一方で、ゾウリムシの核内にはホロスポラ属菌が共生しており、このホロスポラとレジオネラの間で何らかの共生機序が共有されていると考えた。そこで、これら二つの共生細菌の比較ゲノム解析と、その情報を元にした遺伝子欠損株を作出し、それらを用いた解析を行った。始めに、相同性検索によりホロスポラ属菌とレジオネラ属菌の間で高度に保存されている遺伝子をリストアップし、さらにクレード解析を行うことで、この2菌間で同一のクレードを形成する遺伝子だけに絞り込んだ。結果、14個の遺伝子が候補として残った。これら遺伝子をゾウリムシとの共生に関与する因子と考え、*L. pneumophila* Lp02 株を親株として、相同組換えによりそれぞれの欠損株を作出した。各欠損株はゾウリムシでの感染実験に供試し、細胞内菌数や宿主細胞への影響を比較することで共生成立の可否を検討した。結果、作出した14の欠損株のうち、5個の候補遺伝子 (*lpg0492*, *lpg0522*, *lpg0523*, *lpg2141*, *lpg2398*) の欠損株において、ゾウリムシ内菌数の有意な減少が認められた(図2)。しかし、これら5つの欠損株は、培地中での増殖や、あるいはマクロファージ細胞中での増殖能に差異は認められなかった。また、各欠損株と親株 Lp02 およびホロスポラとの共感染実験も行ったが、ゾウリムシ細胞内菌数の回復は認められなかった。さらに、これら各欠損株はいずれも感染の早期に消化・排泄されており、その要因の一つとして、消化酵素に対する耐性の低下が示唆された。以上の結果より、上述した5個の遺伝子はレジオネラがゾウリムシとの共生関係を成立させる上で必須な因子である可能性が示唆された。



〔図2 作成した欠損株のゾウリムシ内菌数〕

以上の研究により、これまで明らかにされていなかったレジオネラ属菌と原生生物との共生メカニズムや、それに関与する因子が複数同定された。今回はゾウリムシモデルを用いた解析であるが、得られた知見を他の原生生物でも応用させることができれば、これを新しいターゲットとすることで、環境中からのレジオネラ排除や、あるいはヒトへの感染防御につながる新しい手法の確立が期待できる。

#### 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 4 件)

1. 渡邊健太, 度会雅久. レジオネラとその宿主としての原生生物. 山口獣医学雑誌. 第 44 号, 1-8, 2017. 査読有り.
2. Nishida, T., Watanabe, K., Tachibana, M., Shimizu, T. & Watarai, M. Characterization of the cryptic plasmid pOfk55 from *Legionella pneumophila* and construction of a pOfk55-derived shuttle vector. *Plasmid* **90**, 30-37, doi:10.1016/j.plasmid.2017.02.004, 2017. 査読有り.
3. Watanabe, K., Nakao, R., Fujishima, M., Tachibana, M., Shimizu, T. & Watarai, M. Ciliate *Paramecium* is a natural reservoir of *Legionella pneumophila*. *Scientific reports* **6**, 24322, doi:10.1038/srep24322, 2016. 査読有り.
4. Watanabe, K., Suzuki, H., Nakao, R., Shimizu, T. & Watarai, M. Draft Genome Sequences of Five *Legionella pneumophila* Strains Isolated from Environmental Water Samples. *Genome announcements* **3**, e00474-15, doi:10.1128/genomeA.00474-15, 2015. 査読有り.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 渡邊健太, 西田隆司, 橋理人, 藤島政博, 清水隆, 度会雅久 (2018). 比較ゲノム解析を用いたレジオネラのゾウリムシ共生因子の探索. 第 91 回日本細菌学会総会.
2. 渡邊健太, 三島真渚美, 西田隆司, 藤島政博, 清水隆, 度会雅久 (2017). レジオネラのゾウリムシ共生必須因子の同定とその機能解析. 第 160 回日本獣医学会学術集会.
3. 渡邊健太, 清水隆, 度会雅久 (2017). Analysis of endosymbiotic mechanisms between *Legionella* and protist hosts using *Paramecium* model. 第 90 回日本細菌学会総会.
4. 渡邊健太, 度会雅久 (2016). *Paramecium* as a natural reservoir of *Legionella pneumophila*. 第 22 回国際動物学会議および第 87 回日本動物学会沖縄大会合同大会.
5. 渡邊健太, 西田隆司, 清水隆, 度会雅久 (2016). ゾウリムシを用いたレジオネラの原生生物共生メカニズムの解析. 平成 28 年度獣医学術中国地区学会.
6. 渡邊健太, 藤島政博, 清水隆, 度会雅久 (2016). *lefA* 遺伝子を介した *Legionella pneumophila* の原生生物共生メカニズムの解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会.
7. 渡邊健太, 中尾亮, 藤島政博, 橋理人, 清水隆, 度会雅久 (2016). Modulation of endosymbiosis by *Legionella pneumophila* in ciliate *Paramecium*. 第 89 回日本細菌学会総会.
8. 渡邊健太 (2015). ゾウリムシを用いたレジオネラの原生生物感染モデルの構築. 平成 27 年度獣医学術中国地区学会.
9. 渡邊健太, 橋理人, 中尾亮, 藤島政博, 清水隆, 度会雅久 (2015). ゾウリムシにおける *Legionella pneumophila* の共生制御メカニズムの解析. 第 158 回日本獣医学会学術集会.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 健太 (WATANABE, Kenta)  
山口大学・共同獣医学部・助教  
研究者番号: 20582208

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
鈴木 治夫 (SUZUKI, Haruo)  
慶應義塾大学・環境情報学部・准教授  
研究者番号：40638772