

平成 21 年 6 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：平成 18 年-平成 20 年
課題番号：18790316
研究課題名 (和文)：レジオネラの新規接着因子 LaiA とそのパラログ分子が肺炎発症に果たす役割の研究
研究課題名 (英文)：Research on the function of a novel adhesion factor LaiA and its paralog molecules that are related to virulence of *Legionella pneumophila*
研究代表者
常 彬 (CHANG BIN)
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号：50370961

研究成果の概要：本研究は *Legionella pneumophila* の接着因子 LaiA およびそのパラログ分子の、宿主への感染における役割と、*L. pneumophila* 感染によって活性化された宿主細胞側の自然免疫応答機構の両面について進めてきた。まず LaiA およびそのパラログ分子は *L. pneumophila* の膜タンパクで、宿主細胞への接着や侵入に関与しているが、本菌の細胞内増殖には関与していないことを明らかにした。次に宿主細胞側の自然免疫応答については、肺胞上皮細胞は *L. pneumophila* 生菌の感染により細胞内シグナル伝達が活性化され、IL-6、IL-8、TNF- α 、MCP-1 などのサイトカインの発現・分泌が見られた。また、このシグナル伝達には NOD1 (Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1) および NOD2 宿主細胞内分子が関与することを明らかにした。しかし、これらのシグナル伝達は LaiA およびそのパラログ分子によっては活性化されなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18 年度	1,400,000	0	1,400,000
19 年度	1,000,000	0	1,000,000
20 年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	0	3,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：レジオネラ、細胞内寄生菌、接着因子、サイトカイン、免疫応答

1. 研究開始当初の背景

レジオネラ属菌は環境中では湿った土壌や淡水に生息し、自由生活するアメーバや繊毛虫など細菌捕食性原虫内で大量に増殖す

る。レジオネラに汚染された人工的水利用設備がヒトへの感染源となる。本属菌は環境中では経気道感染後、ヒト肺胞マクロファージや上皮系細胞内で増殖して、肺炎を引き起こす。レジオネラ肺炎は進行が速く、致命率が

高い特徴があり、その起因菌の約 8-9 割は *L. pneumophila* である。

レジオネラは細胞内寄生菌で、Icm/Dot IV 型分泌装置およびそれに依存して宿主細胞内に送られるエフェクター分子について精力的に研究が進められている。特に 2002 年以後、アメリカのいくつかのレジオネラ研究グループは優れた実験システムを構築し、Icm/Dot IV 型分泌装置によって分泌される約 30 個の分子を同定した。しかし、それら分子のほとんどはレジオネラの病原性に関与していないという結果なので、レジオネラ感染への関与には否定的である。

我々はこの Icm/Dot IV 型分泌装置によって菌体外に分泌されるエフェクター分子 LaiA (*L. pneumophila* adhesion molecule homology to integrin analog of *Saccharomyces cerevisiae*) がヒト肺胞上皮細胞への接着、侵入およびマウスモデルでの病原性へ関与することを証明した (Infection and Immunity 73: 4272-4280, 2005)。また、LaiA は *L. pneumophila* の染色体上の 3ヶ所に 5つのパラログが存在することが報告された (Science 305: 1966-1968, 2004)。これらのことから、LaiA およびそのパラログは *L. pneumophila* の病原機構における宿主特異性あるいは感染細胞内での感染経過特異的な役割を果たす可能性が示唆された。LaiA family が感染細胞の組織特異性あるいは経過特異性に関連があることが解明されれば、細胞内寄生性病原細菌の研究の発展に重要なインパクトを与えることが期待できると考え、この研究を計画した。

2. 研究の目的

L. pneumophila の感染機構及び病態形成を解明するため、我々は LaiA およびそのパラログ分子の役割および機能分担について調

べた。これらの分子が果たす役割から、本菌の宿主への感染過程、病原機構について明らかにすることを目的とした。また、ヒト肺胞上皮細胞を用いて、*L. pneumophila* の宿主細胞への侵入メカニズム、本菌の感染を受けた宿主細胞の免疫応答機構および細胞内シグナル伝達に関与する宿主細胞側の分子を解明することにより、肺胞上皮細胞がレジオネラ感染の病態形成と感染防御に果たす役割についての研究を進めた。

3. 研究の方法

1): LaiA 分子の局在部位の解明: 抗 LaiA 抗体を用いた免疫染色を行い、LaiA 分子の *L. pneumophila* における局在部位を明らかにした。

2): LaiA およびそのパラログの感染における役割: LaiA とそのパラログ分子 (LaiA Family) をコードする遺伝子をノックアウトすることにより、これらの分子の *L. pneumophila* の感染過程における役割についても調べた。

3): LaiA Family の宿主側のリガンドの同定: Bacterial two-hybrid システム系を用いて LaiA の宿主側リガンドの同定を試みた。

4): *L. pneumophila* 感染における肺胞上皮細胞のサイトカインの発現については Reverse Transcriptase (RT)-PCR で、また分泌量については ELISA 法を用いて調べた。さらに、干渉 small interfering RNA (siRNA) や阻害剤を用いて、*L. pneumophila* の肺胞上皮細胞への侵入メカニズム、宿主細胞の免疫応答機構を調べた。また、LaiA とそのパラログ分子 (LaiA Family) をコードする遺伝子をノックアウトした変異株を用いて、宿主細胞の自然免疫機構の活性化と LaiA family との関連性について調べた。

4. 研究成果

- 1): 抗 LaiA 抗体を用いた免疫染色を行ったが、LaiA 分子の *L. pneumophila* における局在を明らかにすることはできなかった。宿主細胞へ感染する前には、LaiA 分子の発現量が少ないものと考えられた。そこで、我々は *L. pneumophila* の膜タンパク、細胞内タンパクを分離し、抗 LaiA 抗体と反応させ、LaiA 分子は *L. pneumophila* の膜に存在するタンパクであることを明らかにした。
- 2): LaiA とそのパラログ (LaiA Family) をコードする遺伝子をそれぞれノックアウトし、肺胞上皮細胞への侵入、細胞内での増殖を調べた。これらの分子は *L. pneumophila* の宿主細胞への侵入には関わるが、細胞内増殖には関与しないことを明らかにした。
- 3): LaiA Family の宿主側のリガンドの同定: Bacterial two-hybrid システム系を用いて LaiA の宿主側リガンドの同定を試したが、同定できなかった。
- 4): *L. pneumophila* 生菌感染における肺胞上皮細胞のサイトカインの発現・分泌について調べた結果、肺胞上皮細胞は IL-6、IL-8、TNF- α 、MCP-1 などサイトカインの mRNA 発現とタンパク分泌が見られた。また、IL-6 と TNF- α の mRNA 発現とタンパク分泌は *L. pneumophila* の細胞内菌数と正の相関があったため、細胞内シグナル伝達経路が *L. pneumophila* 生菌感染によって活性化されることが示唆された。そこで、我々は干渉 small interfering RNA (siRNA) を用いて肺胞上皮細胞の細胞内シグナル伝達に関する分子を調べた。その結果、細胞内シグナル伝達に関する分子 NOD1 (Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1) および NOD2 の siRNA によるノックダウンを行った細胞には、*L. pneumophila* 生菌感染

による IL-6 と TNF- α の mRNA 発現量の減少が見られた。この結果から宿主細胞内に存在する NOD1 および NOD2 分子は *L. pneumophila* 感染の細胞内シグナル伝達に関与することを示唆した。しかし、その過程には LaiA とそのパラログ分子 (LaiA Family) は関与していなかった。

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 7 件)

1. B. Chang, K. Sugiyama, T. Taguri, J. Amemura-Maekawa, F. Kura, and H. Watanabe. Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 147-153, 2009.
2. B. Chang, J. Amemura-Maekawa, and H. Watanabe. An improved protocol for the preparation and restriction enzyme digestion of PFGE agarose plugs for the analysis of *Legionella* isolates. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62: 54-56, 2009.
3. J. Amemura-Maekawa, F. Kura, B. Chang, and H. Watanabe: Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis and sequence-base typing (SBT) of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from Japan. p. 159-162. *In* Marre R et al. (ed.) *Legionella*, ASM Press, USA, 2006.
4. S. Kobayashi, F. Kura, J. Amemura-Maekawa, B. Chang, N. Yamamoto,

and H. Watanabe: Locus on chromosome 13 in mice involved in clearance of *Legionella pneumophila* from the lungs. p.310-312. In Marre R et al. (ed.) *Legionella*, ASM Press, USA, 2006.

5. J. Amemura-Maekawa, F. Kura, B. Chang, A. Suzuki-Hashimoto, M. Ichinose, and H. Watanabe. Distinct difference of *flaA* genotypes of *Legionella pneumophila* between isolates from bath water and cooling tower water. *Microbiology and Immunology*, 52: 460-464, 2008.

6. 常 彬、前川純子、渡辺治雄。レジオネラを解析するパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の改良。病原微生物情報。29: 333-334, 2008

7. 木股裕子、南出正之、名正文、常彬、前川純子。2008年1月、神戸市における公衆浴場でのレジオネラ症集団発生事例。病原微生物情報。29: 329-330, 2008

[学会発表] (計 11 件)

1. J. Amemura-Maekawa, F. Kura, B. Chang, A. Suzuki-Hashimoto, M. Ichinose, and H. Watanabe; Typing of *Legionella pneumophila* Isolates in Japan by *flaA* Gene. The 21st Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* Infections Lisbon, Portugal, May, 2006.

2. A. Suzuki-Hashimoto, J. Amemura-Maekawa, F. Kura, B. Chang, S. Izumiyama, M. Ichinose, H. Watanabe, and

T. Endo; The surveillance of *Legionella* from cooling towers between 2001 and 2006 in Japan. The 22nd Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* Infections Stockholm, Sweden, June, 2007.

3. F. Kura, J. Amemura-Maekawa, A. Suzuki-Hashimoto, B. Chang, S. Izumiyama, M. Ichinose, T. Endo, and H. Watanabe. Surveillance of *Legionella* isolates from bathtub water in Japan: an increase of the rate of *Legionella pneumophila* serogroup 1. The 22nd Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* Infections. Stockholm, Sweden, June, 2007

4. J. Amemura-Maekawa, F. Kura, B. Chang, and H. Watanabe. Sequence based typing and monoclonal antibody typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in Japan. The 23rd Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* Infections. Madrid, Spain, May, 2008

5. B. Chang, N. Honda, S-I. Yoshida, J. Amemura-Maekawa, F. Kura, and H. Watanabe. Discrimination of viable and dead *Legionella* cells by a combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. XII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Istanbul, Turkey, 2008.

6. 前川純子, 倉 文明, 常 彬, 渡辺治雄:

新しい分子疫学的手法である sequence-based typing (SBT) による *Legionella pneumophila* 血清群 1 の臨床および環境分離株の型別 第 80 回日本感染症学会総会, 東京, 2006

7. 前川純子、倉 文明、常 彬、渡辺治雄 : *Legionella pneumophila* のモノクローナル抗体を用いたドレスデンパネルによる分類 第 80 回日本細菌学会総会、大阪、2007

8. 倉 文明、前川純子、鈴木敦子、常 彬、泉山信司、市瀬正之、遠藤卓郎、渡辺治雄 : 浴槽水からのレジオネラ属菌の検出状況 - *Legionella pneumophila* 血清群 1 の増加- 第 81 回日本感染症学会総会、京都、2007

9. 鈴木敦子、前川純子、倉 文明、常 彬、泉山信司、市瀬正之、渡辺治雄、遠藤卓郎 : 冷却塔水からのレジオネラ属菌の検出状況 -2001 年度から 2006 年度まで- 第 81 回日本感染症学会総会、京都、2007

10. 常 彬、前川純子、渡辺治雄 : レジオネラ解析用パルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法の改良 第 82 回日本細菌学会総会、名古屋、2009

11. 前川純子、倉 文明、常 彬、市瀬正之、渡辺治雄 : *Legionella pneumophila* 血清群 1 分離株の遺伝子型別およびモノクローナル抗体型別 第 82 回日本細菌学会総会、名古屋、2009

[図書] (計 2 件)

1. 倉 文明、常 彬、前川純子 : レジオネラ、 図説 呼吸器系細菌感染症 : 疫学、診

断、治療 (荒川宜親、渡辺治雄監修、佐々木次雄編集)、105-22、じほう、東京、2006.

2. 常 彬、渡辺治雄 : レジオネラ感染の分子機構 レジオネラ感染症ハンドブック (斎藤厚 編)、86-95、日本医事新報社、東京、2007、3。

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

特許2008-181272。常 彬、前川純子、倉 文明、渡辺治雄、吉田真一、副島隆志 : レジオネラ属菌の検出方法及び検出キット

○取得状況 (計 1 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者 常 彬

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし