

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06383

研究課題名（和文）ゾウリムシバイオリソースを活用したレジオネラエフェクターの網羅的機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of Legionella effectors using Paramecium as a host model

研究代表者

渡邊 健太（Watanabe, Kenta）

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：20582208

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：レジオネラが持つIV型分泌装置およびエフェクターの、自然宿主との関係性を構築する上での機能や存在意義を解明することを目的に研究を行った。宿主モデルとしてゾウリムシを利用した独自の解析手法を活用した。結果、ゾウリムシ細胞内での増殖や共生にはIV型分泌装置が必要不可欠であったが、宿主への細胞毒性は非依存的であった。こうした結果は、異なる宿主原生生物種では再現されないことも確認された。以上の結果より、IV型分泌機構の機能や依存度は均一的ではなく、原生生物宿主の種や株によって大きく異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レジオネラは基本的にヒトからヒトへの感染が成立せず、菌にとってヒトが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推察される。すなわち、自然環境中でのレジオネラの生態や宿主生物との関係性を理解し制御することは、ヒトへの感染制御に繋がる重要な視点である。本研究成果を応用することで新たなレジオネラ感染制御法が確立されることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This research was focused on determining the function and importance of Legionella type IV secretion systems and effectors in the establishment of relationships with natural hosts. As a tool for this analysis, original methods utilizing the Paramecium strains as a host model were utilized. The results showed that the type IV secretion system was essential for growth and symbiosis within Paramecium cells, but the cytotoxic effects to the host was independent of the type IV secretion system. These results were also confirmed not to be reproduced in different host protist species. These results suggest that the function and dependence of the type IV secretion system is not uniform and varies widely among species and strains of protist hosts.

研究分野：細菌学

キーワード：レジオネラ エフェクター 原生生物 自然宿主 共生

### 1. 研究開始当初の背景

レジオネラはグラム陰性の細胞内寄生菌であり、ヒトに感染すると重篤な肺炎やポンティアック熱と呼ばれる発熱症状を引き起こす。レジオネラが持つ IV 型分泌装置、並びにそれを介して分泌されるエフェクターと呼ばれるタンパク質は、菌の細胞内寄生に必須な主要病原因子である。また、レジオネラは身近な環境中に生息する環境細菌としての一面もあり、淡水中においては原生生物を宿主とする。こうした原生生物宿主との関係性を構築する過程において、IV 型分泌装置やエフェクターといった細胞内寄生に必須の因子を獲得したと考えられている。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分泌装置を介して宿主細胞内へ輸送されると推定されている。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、部分的にしか解明されていない。実際、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数多く存在する。さらに、レジオネラは基本的にヒトからヒトへの感染が成立せず、菌にとってヒトが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推察される。以上のことから、エフェクターの機能からレジオネラの病原性の全貌を解明するためには、既存のアプローチとは全く異なった解析方法の確立が必須である。

### 2. 研究の目的

本研究が目指すのは、未だ全貌が明らかになっていないレジオネラの IV 型分泌装置およびエフェクターの機能解析と、自然宿主との関係性を構築する上で、その存在意義の解明である。エフェクターの解析はレジオネラの感染制御に直結すると考えられており、これまでも多くのエフェクターに関する研究が行われている。しかし、哺乳類培養細胞や実験動物を用いた従来の実験手法では、その機能や存在意義を明確に説明できない場合が多く、実際にレジオネラ症の制圧は成功していない。そこで本研究では、レジオネラの自然宿主である原生生物に着目した新しい解析手法により、エフェクターの本来の機能や意義を把握し、そこから得られた情報を基盤とした新規性の高いレジオネラ感染制御法を確立させる計画である。

### 3. 研究の方法

本研究では、一般的な原生生物であるゾウリムシを利用した独自の解析手法を活用した解析を行った。ゾウリムシは、本学が課題管理機関となっているバイオリソースプロジェクトの利用が可能であり、ここから多種多様なゾウリムシ株を入手し使用した。我々はこれまでに、ゾウリムシが環境中におけるレジオネラの宿主になり得ることを申請者が世界で初めて報告し (Watanabe K *et al.*, *Sci Rep*, 2016; 6:24322)、さらに、このゾウリムシとレジオネラを用いた共生モデルを確立し研究に利用してきた実績がある (図 1)。ゾウリムシにはホロスポラ属菌や未同定の細菌類が共生していることが既に知られており、ゾウリムシという原生生物が、幅広く他者を共生させ得る有用な宿主モデル生物であることを示すものである。



はじめに、入手した数十種類のゾウリムシ株を用いた網羅的な比較解析を行い、本研究に最適なゾウリムシ株の検討を行った。これに派生した実験として、ゾウリムシ株を遺伝学手法により簡便に分類・同定する手法の検討も行った。既知の情報に基づいた random amplified polymorphic DNA (RAPD)法を応用した手法と、新たに構築した multiplex PCR を併用した手法を検討した。

菌については、*Legionella pneumophila* Philadelphia-1 株、および以前に県内の自然環境中から分離した Ofk308 株を使用した。さらにこれらの株から IV 型分泌装置の構成因子である *dotA* あるいは *dotH* 遺伝子、あるいはクオラムセンシングに關与する *lqsA* 遺伝子の欠損株をホモロガスリコンビネーションにより作出し、感染実験に用いた。

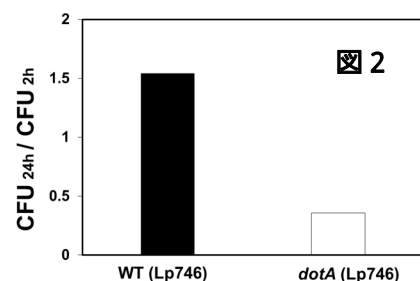
細胞内菌数については、選択培地を用いて CFU を算出することから評価した。ゾウリムシ細胞内における菌の局在や動態については、GFP 発現レジオネラ株を用いた感染実験により、蛍光顕微鏡による観察を行った。また、各遺伝子の発現状況の変動については、real-time PCR による定量的な解析を行った。

#### 4. 研究成果

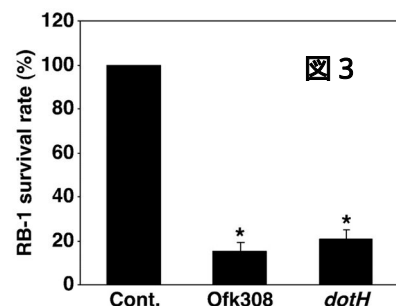
##### (1) 原生生物宿主との共生関係構築過程における IV 型分泌機構の関与

多くのゾウリムシ株を用いた網羅的な比較解析を行った結果、種としては *Paramecium caudatum* がレジオネラの宿主モデルとして適しており、その中でも特に RB-1 株の操作性や安定性が高く、解析のための研究ツールとして最適であることが確認されたため、以降はこの RB-1 株を選択して実験に使用した。

まず Philadelphia-1 株をこの RB-1 株に感染させたところ、菌はゾウリムシの細胞内に留まり、穏やかな寄生・共生関係が成立したが、*dotA* および *dotH* の欠損株においては、そうした関係性が維持されず、IV 型分泌機構がその細胞内共生の維持に必須な因子であることが示唆された(図 2)。



一方で、宿主ゾウリムシへの傷害性が高く、細胞内共生関係が構築されないレジオネラである Ofk308 株においては、このゾウリムシ宿主への細胞毒性に IV 型分泌機構は関与しなかった(図 3)。こうした現象が、ゾウリムシ以外の原生生物宿主においても再現されるのか否かを確認する目的で、同じ繊毛虫類に属し、レジオネラの宿主としての報告もあるテトラヒメナを用いて同様の検討を行った。結果、ゾウリムシを宿主として用いた場合とは異なり、Ofk308 株が示すテトラヒメナ宿主への細胞毒性は IV 型分泌機構に依存的であった。これらの結果より、IV 型分泌機構の機能や依存度は均一的ではなく、原生生物宿主の種や株によって大きく異なることが示唆された。さらに、原生生物宿主の細胞内という特殊な環境下において、菌のクオラムセンシング機構が種々のエフェクターや IV 型分泌装置自体の発現



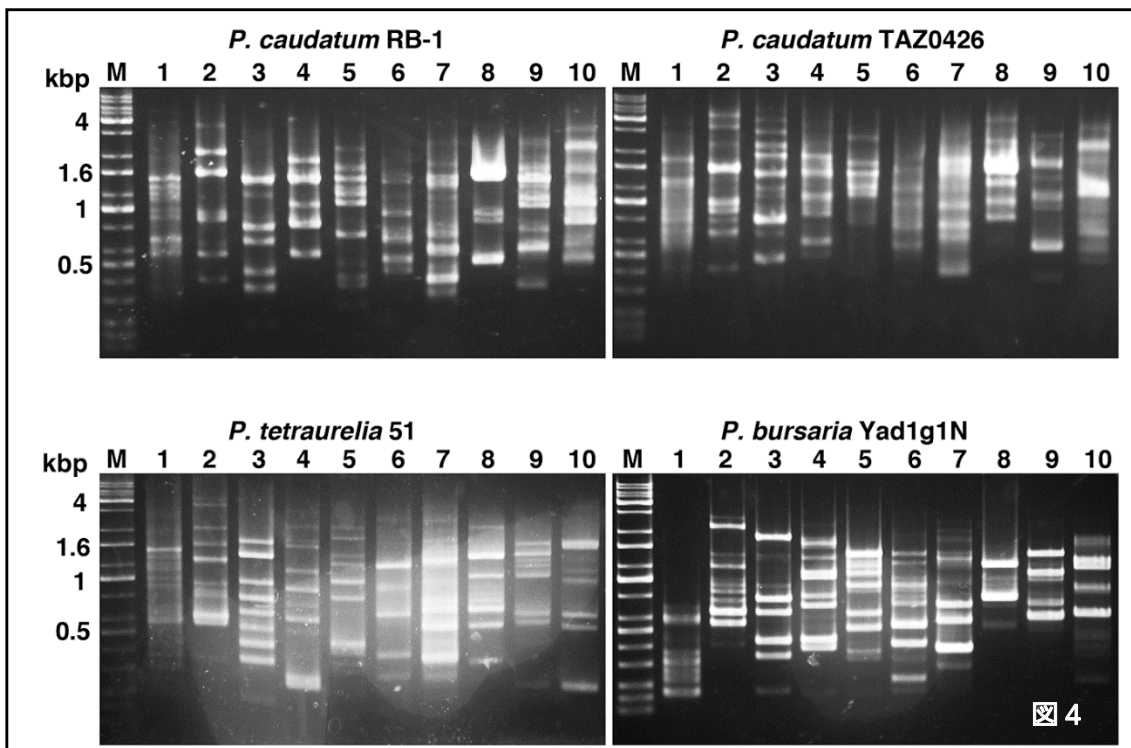
も制御しているのではないかと考え、関連因子である *lqsA* の欠損株を用いた遺伝子発現解析を行った。結果、人工培地や哺乳類培養細胞内での増殖時とは異なり、ゾウリムシ細胞内では一部の病原因子やエフェクターの発現がクオラムセンシング機構の制御下にあることが明らかとなった。ゾウリムシなどの原生生物宿主との関係性構築においてのみ特異的に機能するような特殊なエフェクターやその機能解析には至らなかったが、本研究により得られた知見は、レジオネ

ラが自然環境中において、ゾウリムシやテトラヒメナを含む多種多様な原生生物宿主に対して柔軟にその関係性を構築させているメカニズムの解明に繋がるものであり、これらを応用することで新たなレジオネラ感染制御法が確立されることが期待できる。

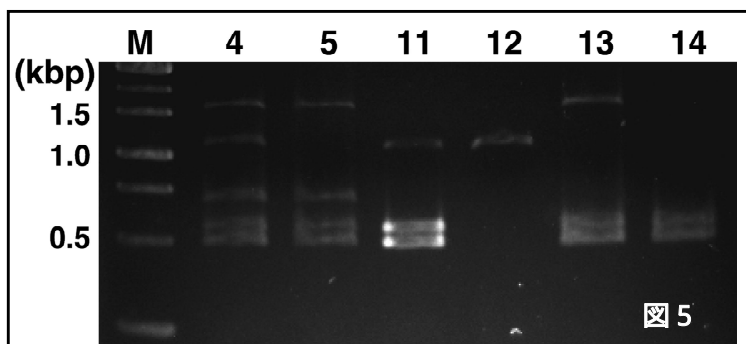
## (2) 宿主ゾウリムシの遺伝学的分類・同定法の構築

前述の通り、レジオネラは宿主ゾウリムシの株毎に、その関係性が大きく変化することがわかってきた。すなわち、全てのゾウリムシがレジオネラの自然宿主として機能するのではなく、その適合性は種や株に依存する部分が多いことが示唆されている。研究内容や解析の目的に最も合致した最適なゾウリムシ株を選択することは重要であるが、ゾウリムシ株の分類や性状解析は、形態学的な観察や、接合試験などの古典的な手法に依存する部分が多い。そこで本研究では、ゾウリムシ宿主の研究ツールとしての利便性を向上させる目的で、遺伝学的な手法による簡便な株の識別・分類法の確立を目指した。

まず、既存の情報を元に、RAPD 法を応用した同定法の構築を試みた。RAPD 法を単独で実施した場合には、大まかな種や株の区別は可能であったが、それ以上の接合型やシンジェンまでは区別できなかった(図4)。また、RAPD 法はその性質上、ゾウリムシにエサとして与えている細菌、



あるいは共生しているクロレラ由来のゲノム DNA の混入が結果に影響を与えることから、これを考慮する必要があることがわかった。そこで、RAPD 法の結果を元に構築した multiplex PCR を併用することで、複数の株を特異的に識別することが可能となった(図5)。今後は野外株を含めた多くの株



Multiplex PCR の結果。株毎に出現するバンドパターンが異なることで、株の分類ができる。

での検討を重ね、より特異性と汎用性の高い手法に改良することで、病原細菌の自然宿主となり得るゾウリムシ株を同定・検出する技術に発展させていく計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsumoto Sonoko, Watanabe Kenta, Imamura Akiko, Tachibana Masato, Shimizu Takashi, Watarai Masahisa	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparative Analysis Between Paramecium Strains with Different Syngens Using the RAPD Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Ecology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00248-021-01864-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Kenta, Motonaga Akane, Tachibana Masato, Shimizu Takashi, Watarai Masahisa	4. 巻 14
2. 論文標題 Francisella novicida can utilize Paramecium bursaria as its potential host	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology Reports	6. 最初と最後の頁 50-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1758-2229.13029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Sonoko, Watanabe Kenta, Kiyota Hiroko, Tachibana Masato, Shimizu Takashi, Watarai Masahisa	4. 巻 17
2. 論文標題 Distinction of Paramecium strains by a combination method of RAPD analysis and multiplex PCR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 265139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0265139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Takemasa, Shimizu Takashi, Inagaki Fumiya, Okazaki Shoma, Saha Shib Shankar, Uda Akihiko, Watanabe Kenta, Watarai Masahisa	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of Membrane-Bound Lytic Murein Transglycosylase A (MltA) as a Growth Factor for Francisella novicida in a Silkworm Infection Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.581864	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Kenta, Higuchi Yusei, Shimmura Mizuki, Tachibana Masato, Fujishima Masahiro, Shimizu Takashi, Watarai Masahisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Peculiar Paramecium Hosts Fail to Establish a Stable Intracellular Relationship With Legionella pneumophila	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.596731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 渡邊健太、度会雅久	4. 巻 47
2. 論文標題 環境由来レジオネラの血清群および遺伝子型の解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 山口獣医学雑誌	6. 最初と最後の頁 7-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Takashi, Nakagawa Natsuko, Watanabe Kenta, Shimizu Takashi, Watarai Masahisa	4. 巻 2019
2. 論文標題 Attenuated Legionella pneumophila Survives for a Long Period in an Environmental Water Site.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Reserch International	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/8601346.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡邊健太, 清水隆, 度会雅久
2. 発表標題 Francisella novicidaとその自然宿主候補としてのミドリゾウリムシ
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊健太, 度会雅久
2. 発表標題 ゾウリムシ共生細菌間における比較ゲノム解析を用いた共生因子の同定
3. 学会等名 第58回山口県獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊健太, 清水隆, 度会雅久
2. 発表標題 Paramecium bursaria as a novel host model for Francisella novicida
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 元永朱音, 渡邊健太, 清水隆, 度会雅久
2. 発表標題 ミドリゾウリムシにおけるFrancisella tularensisの共生とその因子の探索
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新村瑞葵, 渡邊健太, 清水隆, 度会雅久
2. 発表標題 レジオネラ消化型ゾウリムシの性状解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 渡邊健太、清水隆、度会雅久
2. 発表標題 ゾウリムシ食胞膜抗体を用いたレジオネラ共生胞の性状解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊健太、清水隆、度会雅久
2. 発表標題 Analysis of Legionella-containing vacuoles in Paramecium hosts
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊健太、西田隆司、清水隆、度会雅久
2. 発表標題 新しい原生物宿主モデルを用いたレジオネラ研究
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊健太、清水隆、度会雅久
2. 発表標題 レジオネラによるゾウリムシ宿主の貪食阻害効果の解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊健太、樋口祐生、清水隆、度会雅久
2. 発表標題 ゾウリムシを用いたレジオネラ排除法の検討
3. 学会等名 令和元年度獣医学術中国地区学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊健太、橘理人、清水隆、度会雅久
2. 発表標題 自然宿主との多様な関係性に着目したレジオネラ研究
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関