

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390131

研究課題名（和文） レジオネラが示す環境生理学的現象の分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular analysis of physiological phenomena of Legionella expressed in the environment

研究代表者

吉田 真一（YOSHIDA SHIN-ICHI）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：60128113

研究成果の概要（和文）：

レジオネラ属の細菌はヒトに致死的な肺炎を引き起こす細菌である。他の肺炎を起こす細菌やウイルスはふだん上気道に生息しており、そこから主に飛沫感染によりヒトに感染する。これに対しレジオネラ属の細菌は淡水や土壌などを生息場所としており、環境からヒトに感染することが特徴である。したがってレジオネラによる感染を、感染源・感染経路をふくめて総合的に理解するには、レジオネラとヒトとの寄生関係だけではなく、レジオネラが自然界でどのような生存をしているかを理解することが必要である。レジオネラの自然界での生存戦略の特徴はアメーバなど原虫の中で増殖できる能力をもっていることである。その他にも自然界と哺乳動物との間にある環境条件の違いを乗り越える能力など、研究すべき課題は多い。本研究では（1）自然界の（体温より）低い温度での増殖を可能にする遺伝学的機序、（2）細胞内での増殖を可能にする糖代謝の解析、（3）細胞内増殖の場の解析、を行った。その結果、（1）*L.pneumophila* は低温でのアメーバ内増殖を可能にする遺伝子をもっている、（2）糖代謝には Entner-Doudoroff 経路を使い、この経路は細胞外細胞には使われていないが細胞内増殖には必須である、（3）*L.oakridgensis* が宿主細胞の小胞体内で増殖している可能性があることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Legionellae cause pneumonia in humans. Microbes that cause pneumonia usually live in the upper-respiratory organs and infect humans by droplets. In contrast, *Legionella* organisms are living in the environment such as surface water and soil. Hence, to totally understand *Legionella* infection, it is important to know how *Legionella* survives under environmental stress. One of their remarkable characteristics is their ability to grow in amoeba. They also have other abilities to survive in environmental stresses like low temperatures, low nutrition, etc.

In this study, we tried to elucidate (1) the molecular mechanism by which they are able to grow in the amoeba at low temperature, (2) glucose metabolism which enables intracellular growth, and (3) micromillieu for intracellular bacterial growth in the host cells.

As a result, we showed that (1) *L. pneumophila* have genes that enable intracellular growth in amoeba at low temperature, (2) *L. pneumophila* uses the Entner-Doudoroff pathway for glucose metabolism and the pathway is essential for intracellular growth but not for in vitro growth, and (3) *L. oakridgensis* may grow in the endoplasmic reticulum of the host cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010年度	4,100,000	1,100,000	5,200,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,130,000	18,330,000

研究分野：自然科学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：レジオネラ、細胞内寄生、糖代謝、環境、生理学

1. 研究開始当初の背景

レジオネラがヒトのマクロファージ内で増殖するという能力は、レジオネラがヒトに肺炎をおこすという病原性の発現に最も重要な能力である。このレジオネラの能力は地球上に多細胞生物が出現する以前にアメーバなどの原虫と出会い、その殺菌力に打ち勝つために獲得された能力であると考えられる。この例は、細菌が自然界の中でどのように生息し適応・進化しているかを研究することが、ヒトに対する細菌の病原性を理解するためにも大切であることを示している。つまり、バクテリアとヒト宿主との関係だけを研究すれば十分であるとする立場ではなく、病原細菌を自然界に生息する生き物として生態学を含めて統合的に研究することの大切さを教えている。

本研究では、生態系におけるレジオネラの行動を環境生理学的現象として捉え、以下に挙げる現象やこれまでの研究で得られた結果について、その分子メカニズムを遺伝

学的側面と生化学的代謝の側面の両方から明らかにし、病原性の理解にも繋げようとするものである。

2. 研究の目的

- (1) レジオネラは環境中とくにアメーバ内の低温下で増殖できる、そのために必要な遺伝子の同定
- (2) *Legionella pneumophila* がバイオフィルムを形成する際、菌体がフィラメント化する機序の解析と細胞分裂を始めるトリッガーの研究
- (3) レジオネラ属が産生する蛍光物質の同定とその役割を明らかにする
- (4) 海水由来の温泉から分離されたレジオネラの病原性が強い理由の解明
- (5) グルコース代謝が細胞内増殖性に与える影響についての研究
- (6) 細胞内マイクロコロニーの形態の多様性と増殖場所についての研究

このうち、本報告書では(1)(5)(6)の研究成果について述べる。(2)については、レジオネラ以外の細菌を使った実験が当教室で進んでおり、レジオネラへの応用研究が可能となりつつあるが成果としての発表には至らなかった。(3)については、蛍光色素の結晶化に成功せず未だ成果が出ていない。(4)については、研究者の不足により研究が進まなかった。

3. 研究の方法

個々の実験についての方法を述べることは冗長になるので、共通の方法で大事なものについてのみ述べる。

- (1) プロモーター活性を GFP 活性として測定できる系を作成した。
- (2) RT-PCR 法により *icmN* とその下流の遺伝子のオペロン解析を行った。
- (3) 遺伝子欠損株の作成。*L. pneumophila* で発現できるカナマイシン耐性遺伝子を標的遺伝子に挿入し、挿入変異株を作成した。標的遺伝子は、*icmN* とそのオペロン構成遺伝子、および、Entner-Doudoroff 経路を形成する *glk* (グルコキナーゼ)、*edd* (ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ)、*eda* (2-ケト-3-デオキシホスホグルコン酸アルドラーゼ)、*eda* (シュガートランスポーター) である。
- (4) 酵素活性の測定。グルコキナーゼの活性は基本的に過去に報告されているように、D-[U-¹⁴C]-グルコースの ATP 依存的なリン酸化を測定することによって評価した。ホスホグルコン酸デヒドラターゼと 2-デ

ヒドロ-3-デオキシホスホグルコン酸アルドラーゼを組み合わせた活性は、基本的に過去の報告と同様に 2 つのステップを用い NADH の消費からピルビン酸の生成量を計算して測定した。

- (5) 細胞内増殖は A549 ヒト肺胞上皮、A/J マウスの腹腔マクロファージ、*Acanthamoeba culbertsoni* を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) *L. pneumophila* の *icmN* 遺伝子の役割についての解析

レジオネラ属の細菌はヒトに感染後はマクロファージの中で 37°C で増殖する。しかし自然環境下ではアメーバなどの細菌捕食性原虫の中で、より低い温度で増殖しており、低温下でのアメーバ内増殖を可能にするメカニズムが働いている。我々は以前 *L. dumoffii* のプラスミド上にある *nickase* が低温での DNA の増幅 (さらには菌の増殖) に必要であることを報告した。一方、Shuman らは *L. pneumophila* の type IV secretion system を構成するタンパク群の 1 つをコードする遺伝子である *icmN* がマクロファージ内での増殖には必要とされないが、アメーバ内での増殖には必要であると報告した。しかし、これは宿主細胞の違いによるものではなく、宿主細胞を培養する温度の違いによるのではないかと、われわれは考え *icmN* の低温下での役割について検討した。その結果 *icmN* から下流の遺伝子はオペロンとなっており、さらに *icmM* からは secondary promotor が作動していることがわかった。*icmN* knock out (KO)

株でも 37°C で細胞内増殖が起こるのはこのためであった。しかし、25°C では *icmN* KO 株のアメーバ内増殖は全く起こらなかった。このことより、*icmN* 遺伝子産物が低温 (25°C) での増殖に必須であることが明らかとなった。

(2) *Legionella pneumophila* のグルコース利用に関する研究

ヒトに肺炎をおこす *Legionella pneumophila* は、グルコースを添加しない培地でも増殖できるため、グルコースを呼吸にも発酵にも使わないとされていたが、申請者らは厳密なグルコースの測定により、試験管内増殖をする際にグルコースを消費することを明らかにした。さらにグルコース代謝は解糖経路ではなく Entner-Doudoroff 経路によることを、酵素遺伝子欠損株の作成によって証明した。グルコースが利用できなくなった変異株も、試験管内では増殖できた。しかし興味あることにこの変異株は細胞内で増殖する能力を失っていた。レジオネラの細胞内増殖に何故グルコースが必須であるのか今後の課題である。

(3) *L. oakridgensis* の細胞内増殖において、本菌が特異的なマイクロコロニーを形成することを見出したので、電顕にて増殖場所の特定を行った。*L. oakridgensis* は上皮細胞、マクロファージ系細胞、アメーバの中で増殖できるが、特に Vero 細胞の中では細菌細胞が束となってつながる形態、いわゆる「ヘビ状増殖」を呈する。この形態は最初核を取り囲むように伸長し、しだいに細胞質内でヘビ状増殖を呈す。私たちはこの特異な増殖形態が宿主細胞の小胞体内で起こっていると推察し、現在その可能性に

つき検討している。

(4) その他

L. pneumophila の蛍光物質を HPLC で分離後、結晶化を試みているが未だ成功していない。

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 5 件)

全て査読がある雑誌である。

1. Qin T, Iida K, Piao Z, Shiota S, Ren H, Shao Z, and Yoshida S. (2012) Importance of the *icmN* gene in the growth of *Legionella pneumophila* in amoebic cells at low temperature. Canadian Journal of Microbiology **58**:490-501.
2. Takekawa Y, Saito M, Wang C, Qin T, Ogawa M, Kanematsu T, and Yoshida S. (2012) Characteristic morphology of intracellular microcolonies of *Legionella oakridgensis* OR-10. Canadian Journal of Microbiology **58**:179-183.
3. Harada E, Iida K, Shiota S, Nakayama H, and Yoshida S. (2010) Glucose metabolism in *Legionella pneumophila*: Dependence on the Entner-Doudoroff pathway and connection with intracellular bacterial growth. Journal of Bacteriology **192**:2892-2899.

4. Matsuda F, Fujii J, and Yoshida S. (2010)
Autophagy induced by 2-deoxy- D-glucose
Suppresses Intracellular Multiplication of
Legionella pneumophila in A/J Mouse
Macrophages.
Autophagy 5:484-493.
5. Qin T, Iida K, Hirakawa H, Shiota S,
Nakayama H, and Yoshida S. (2009)
Conjugative plasmid pLD-TEX-KL
promotes growth of host bacterium
Legionella dumoffii at low temperatures.
Archives Microbiology 191:543-551.

〔学会発表〕（計 1 件）

Shin-ichi Yoshida

Legionella physiology in the environment.

Legionella 2009 Oct.15, 2009, Paris

〔図書〕（計 1 件）

吉田真一 レジオネラ属 p.497-501、戸田
新細菌学 南山堂

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：レジオネラ属菌の検出方法および蛍
光物質

発明者：吉田真一、ほか7名

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2009-109253

出願年月日：2009.4.28

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/bact/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田真一 (YOSHIDA SHIN-ICHI)

研究者番号：60128113

(2)研究分担者

藤井潤 (FUJII JUN) (平成 21 年度のみ)

研究者番号：60271441

飯田健一郎 (IIDA KEN-ICHIRO) (平成
21 年度のみ)

研究者番号：00346777

(3)連携研究者

なし