

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15444

研究課題名（和文）レジオネラ症の重症化に関わるレジオネラ・ニューモフィラの高病原性因子の解明

研究課題名（英文）The analysis for virulence factors of the legionella pneumophila strains with highly pathogenicity

研究代表者

高橋 佑介（TAKAHASHI, YUSUKE）

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員

研究者番号：70827146

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：臨床分離株および環境分離株のハチノスツツリガに対する毒性評価では、毒性の高い株と低い株は保有遺伝子の有無で描出した系統樹で同じcladeに分類される傾向にあり、近縁なLegionella pneumophila SG1はハチノスツツリガに対して同程度の毒性を示すことが示唆された。例えばST138の5株は、毒性が普通が高い株として分離された。高病原性遺伝子候補の探索では、強毒株で保有される高病原性遺伝子の候補遺伝子を探索したところ、タンパク質の機能が明らかな遺伝子には、L. pneumophilaが生存に優位に働く代謝酵素遺伝子が多く含まれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レジオネラ症のヒトでの重症化について、これまで高齢化や喫煙など、宿主側の因子に焦点がおかれてきたが、病原体側の因子については十分には明らかになっていない。本研究でST138には強毒株が多い可能性が示唆された。引き続きデータを集積し、強毒株に多い遺伝子型が多く分離される施設の傾向を把握することで、有効な予防的措置の立案に貢献しうる。また、新規高病原性遺伝子の発見にもつながる成果となり、レジオネラ菌における細菌学研究的発展に寄与できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Survival analysis by Gallelia mellonella suggested that closely related isolates of Legionella pneumophila, such as ST138 strains, are similarly toxic to hosts including human.

The better part of candidate virulent genes chosen by whole genomic analysis and survival analysis using Gallelia mellonella were metabolizing enzyme genes, including Transcriptional repressor SmtB, Thioredoxin reductase or 3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ.

研究分野：細菌学

キーワード：レジオネラ ハチノスツツリガ 全ゲノム解析 強毒株 高病原性遺伝子

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) レジオネラ症は年々、発生件数が増加しており、超高齢化社会を迎えた我が国では、今後、死者が大幅に減少する見込みは低い。感染リスクを減らすための現実的で効果的な対策が求められる。病原体のサーベイランスを目的とし、汎用される Sequence-Based Typing (SBT) で決定される Sequence Type (ST) は、重要な疫学情報となるが、さらに病原性の高さを強毒株が保有する高病原性因子によって分類できれば、レジオネラ症の感染の実態解明につながるより有益な疫学情報となる。

(2) 近年、ハチノスツツリガ (*Galleria mellonella*) が、ヒトマクロファージやアメーバと同様の細胞内感染様式をとる、ヒトのレジオネラ症の有用な感染モデル生物の 1 つとして注目されている。レジオネラを幼虫に接種すると、菌体は血液中の貪食作用をもつ血球細胞に取り込まれ、型分泌装置を利用した感染様式を取り、増殖する。やがて、体全体が黒色に変化し、運動性を失い死に至る。既報のように、72 時間で死亡する個体数が菌株により異なり、結果が再現性よく示されることから、各菌株のヒトへの病原性を相対的に推定することができると思われる。

2. 研究の目的

ハチノスツツリガへの致死活性を指標に *Legionella pneumophila* SG1 の毒性を相対的に評価し、強毒株で優位に保存されている高病原性遺伝子を探索する。

3. 研究の方法

(1) ゲノム情報の取得

国内で分離されたレジオネラ症患者の臨床分離株 *L. pneumophila* SG1 60 株 (CS001~060)、環境分離株 *L. pneumophila* SG1 10 株 (MS001~009, MS011) および標準株 (ATCC33152 *L. pneumophila* SG1, ATCC33735 *L. pneumophila* SG5) 2 株、計 72 株の DNA を DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) で抽出した。illumina DNA Nextera でライブラリー調整後、illumina iSeq100 あるいは HiSeq でショートリードシーケンズデータを取得した。

(2) パンゲノム解析

SPAdes で各菌株の de novo assembly を行い、得られたデータを GenAPI ツール (<https://github.com/MigleSur/GenAPI>) でのパンゲノム解析を実施した。また、legsta (https://www.cheese-professional.com/article/column/detail.php?KIJL_ID=1162) ツールで遺伝子型 (Sequence type; ST) を決定した。図の作出は、R ver. 4.4.0 を用い、ggtree で描写した。

(2) *Galleria mellonella* への接種試験

標準株 2 株を 1 匹あたり 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 CFU/10 μ L 接種 (n=10) し、72 時間後の LD50 を R ver. 4.4.0 で算出した。臨床分離株は 10 株ずつを標準株と同時に接種し、標準株とカプランマイヤー曲線を作成して、標準株との相対的な毒 SBT 性の強さを評価した。

(3) 高病原性遺伝子の探索

各菌株の保有遺伝子データと毒性評価データから、スピアマンの順位相関係数により、毒性の高い菌株に保有されている高病原性遺伝子候補を調べた。

4. 研究成果

(1) 臨床分離株および環境分離株の毒性評価

各菌株の病原性を 1: less virulent、2: virulent、3: more virulent とし、GenAPI ツールによる解析結果をもとに作図した系統樹とともに図 1 に示した。毒性の高い株と低い株は同じ clade に分類される傾向にあり、近縁な *L. pneumophila* SG1 はハチノスツツリガに対して同程度の毒性を示すことが示唆された。例えば ST138 の 5 株は、毒性が普通か高い株として分離された。

(2) 高病原性遺伝子候補の探索

強毒株で保有される高病原性遺伝子の候補遺伝子 virulent associated genomic element (GEv) を探索した。そのうち順位相関係数が高い順に 15 遺伝子 (GEv1~15) を表 1 に示した。GEv1~15 のうち 9 遺伝子は機能不明なタンパク質をコードする遺伝子だった。タンパク質の機能が明らかな遺伝子には、*L. pneumophila* が生存に優位に働く代謝酵素遺伝子が多く含まれていた。機能未知な遺伝子についてもより詳細に解析することで新規病原遺伝子の発見につながる可能性がある。

<参考文献>

1. Allen, Jonathan P., et al., *PNAS*, 117 (12) 6811-6821, (2020).
2. Harding, C. R., et al., *J Vis Exp*, 81 81, (2012).

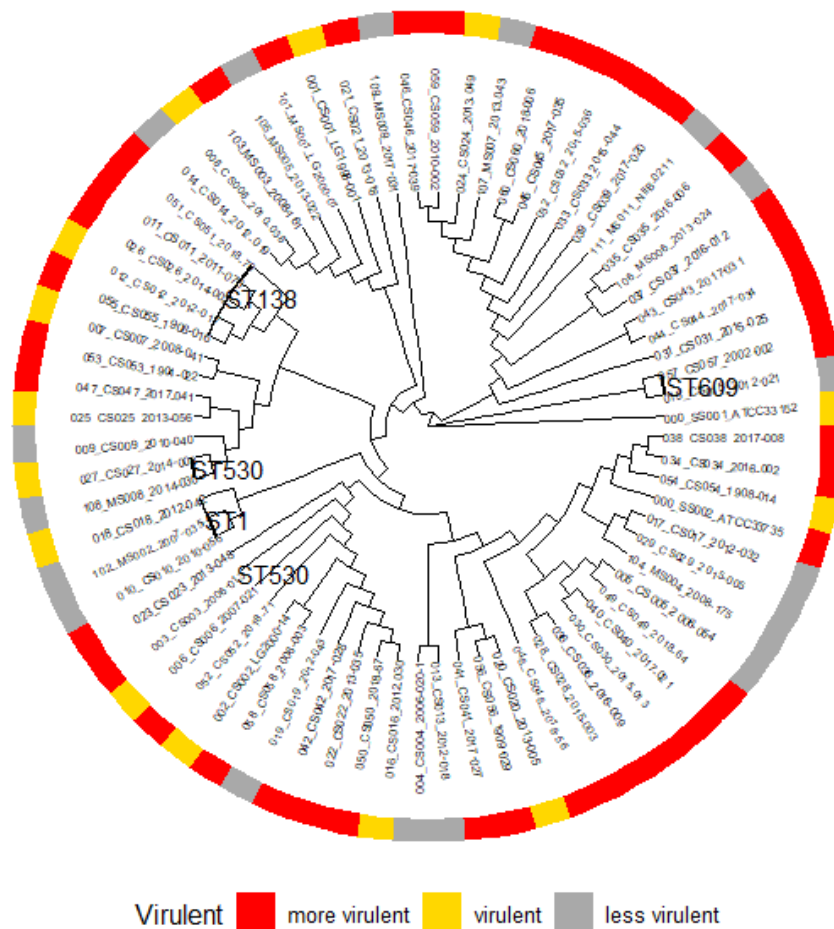


図1 *L. pneumophila* の系統樹と ST およびハチノスツヅリガに対する毒性分類

gene	rho	product
GEv1	0.259	hypothetical protein
GEv2	0.259	hypothetical protein
GEv3	0.246	hypothetical protein
GEv4	0.234	Transcriptional repressor SmtB
GEv5	0.234	Thioredoxin reductase
GEv6	0.234	hypothetical protein
GEv7	0.234	Ferredoxin
GEv8	0.234	hypothetical protein
GEv9	0.234	hypothetical protein
GEv10	0.228	hypothetical protein
GEv11	0.228	hypothetical protein
GEv12	0.227	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ
GEv13	0.227	Nicotinate-nucleotide adenyltransferase
GEv14	0.227	Lipoteichoic acid synthase 1
GEv15	0.227	hypothetical protein

表1 高病原性遺伝子の候補遺伝子の例。Rho はスピアマンの順位相関係数。Product は遺伝子がコードするタンパク質名。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋佑介、山口貴弘
2. 発表標題 ゲノム情報に基づく Legionella pneumophila の Galleria mellonella における致死活性予測モデルの構築
3. 学会等名 第17回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------