

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850181

研究課題名(和文) 微生物共生システムを基盤としたレジオネラ制御法に関する研究

研究課題名(英文) Control method of Legionella based on microbial symbiotic system

## 研究代表者

橘 理人 (Tachibana, Masato)

国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・研究助手

研究者番号：20636831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：レジオネラ菌の感染により引き起こされるレジオネラ症は、死亡率が高いにもかかわらず対策が十分に行われていない。その理由として、感染制御を行うにあたり重要な情報である環境中の生態に関して不明な点が多いことがある。環境中の重要な宿主として原生生物が知られており、原生動物の一つであるゾウリムシに注目した新しい解析モデルを構築した。このゾウリムシモデルを用いた研究から、原生生物内におけるレジオネラの動態の一端(関係性、ゾウリムシ内における消化回避関連因子)を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Legionella pneumophila is well known as the causative agent of Legionnaires' disease. The fatality rate of this disease is over 5%. The countermeasure to this bacteria is insufficient because the ecology of this bacteria in environment is not fully clear. It is well known that L. pneumophila can survive in the environment in close association with protists such as acanthamoeba. This association leads to the replication and spread of L. pneumophila. However, mechanisms of infection and endosymbiosis in protistan hosts are not fully understood. Paramecium spp. are appreciated as model organisms for the analysis of cellular and molecular biology, including phagocytosis and exocytosis, and endosymbiosis. This study demonstrated that L. pneumophila has functional systems to control endosymbiosis with paramecium spp.

研究分野：細菌学

キーワード：Legionella pneumophila Paramecium caudatum 共生 レジオネラ症 ゾウリムシ 解析モデル 水系感染症

## 1. 研究開始当初の背景

レジオネラ症は国内外において重要な感染症の一つである。近年、日本国内における報告数は増加傾向にあり、近 5 年間 (2010 年～2014 年) で約 4,800 人の感染が報告され、死者数は 286 人に上っている (死亡率約 6%)。国外においても報告数は多く、2012 年のカナダにおいて、1 度のアウトブレイクで 176 人の感染と 11 人の死亡 (死亡率約 6%) が確認されている。高い死亡率 (季節性インフルエンザの死亡率は 0.05%) にもかかわらず、その対策は十分とは言えない状況である。対策が不十分である理由として、原因菌である *Legionella pneumophila* (以下レジオネラ) の生態・病原因子など対策を行うにあたり重要なことの多くが明らかになっていないことがあげられる。レジオネラは水中および土壌中に存在するアカントアメーバなどの原生生物と共生し、自然界に存在していると考えられている。この共生はレジオネラにとって大きなメリットがあると考えられており制御するにあたり非常に重要であると考えられるが、その詳細な生態は不明な点が多い。そこで、我々はこれまでにレジオネラの新たな宿主としてゾウリムシを見出し、詳細な解析を行った。その成果により、我々は世界に先駆けて、ゾウリムシを用いたレジオネラと原生生物との共生システム解析モデルを構築した。ゾウリムシはゲノム解読およびトランスクリプトーム解析が行われていることに加えて変異株の作成法の構築がされていることから、遺伝子レベルの解析を行うことができる。この解析モデルを用いて解析した結果、レジオネラとゾウリムシとの関係性は以下の 3 つに類型化できることが示された。それは、1) レジオネラがゾウリムシに毒性を示し、菌の感染によりゾウリムシが死滅する型 (毒性型)、2) レジオネラがゾウリムシの中で生き残り、共存していく型 (共生型)、3) レジオネラがゾウリムシの中で消化され、菌が死滅する型 (消化型) の 3 つである。このことから、これまでレジオネラは原生生物に寄生若しくは共生していると考えられていたが、それだけではなく様々な関係性を持つことが認められた。また、レジオネラのゾウリムシ内での増殖に関与する因子の検索・同定・機能解析を行う過程において、種々のゾウリムシ株への作用について検討を行った結果、国内で分離されたゾウリムシの 1 株が毒性型レジオネラに対して抵抗性を示すことが認められた。この抵抗性ゾウリムシは、毒性型レジオネラの感染による傷害を回避し、他のゾウリムシ株において不可能であった毒性型レジオネラの消化を可能としていることが考えられ、制御ゾウリムシ作成の着想に至った。

これらのことから、ゾウリムシを用いた共生システム解析モデルを駆使し、レジオネラの新規制御法の確立を最終目的とする分子生物学的解析を企図するに至った。

## 2. 研究の目的

### (1) ゾウリムシ内におけるレジオネラの動態の解明

これまでの解析により、共生型と消化型のレジオネラが存在することが明らかとなっている。レジオネラがゾウリムシの消化を回避するシステムの解明を目的とし、共生に関連している因子の同定および機能解析を行う。また、ゾウリムシのレジオネラを消化するメカニズムの解明を目的とし、消化に関連する因子の同定および機能解析を行う。

### (2) ゾウリムシに対する毒性因子の解明

これまでの研究から、ゾウリムシを死滅させる毒性型のレジオネラが存在し、また毒性型に抵抗をしめす抵抗性ゾウリムシが存在することが明らかとなっている。レジオネラのゾウリムシに対する毒性に関連する因子の検索・同定および機能解析を行う。同定された毒性因子がヒトにおける病原因子になりうるか確認する。また、抵抗性ゾウリムシの抵抗性に関して解析を行い、抵抗性に関連する因子の検索・同定および機能解析を行う。

### (3) レジオネラ制御ゾウリムシの開発

上記の研究成果を基盤とし、環境中のレジオネラを制御することのできるゾウリムシの開発を行う。開発したゾウリムシを用いて、環境モデルにおいてレジオネラを制御できるか評価する。また、種々のレジオネラ株を用いることで、広範に利用できるシステムが否かを確認する。ここまでの研究では用いなかったゾウリムシ株を用いて、制御ゾウリムシに有用な機能の解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) レジオネラとゾウリムシとの共生システムの解明

レジオネラは、ゾウリムシ内において Dot/1cm に依存しない消化回避システムを有していることが予測されるため、本研究では、ゾウリムシ内で共生型レジオネラがどのような消化回避システムを用いているかを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析する。まず、ファゴソームから脱出をするか否かを確認する。脱出する場合、脱出システムの存在が示唆される。脱出しない場合、ファゴソーム内での消化を回避することが示唆される。ファゴソームとリソソームの融合の識別には LysoTracker を用い、ゾウリムシ内でレジオネラ感染による融合障害が行われているか否かを明らかにする。融合障害が確認されなかった場合は、酸性化に耐えるシステムの存在が示唆され、確認された場合は融合障害システムの存在が示唆される。この融合障害システムには Dot/1cm が関連していないことが考えられるので、新規の回避システムの存在が示唆される。ここまでの実験には、共生型レジオネラ、消化型レジオネラおよび Dot/1cm 欠損レジオネラを用いて比較検討す

る。回避システムに関連したタンパクの検索には、培養温度によるタンパク発現の比較検討およびトランスポゾンによる欠損株の作成により行う。

#### (2)ゾウリムシに対する細胞毒性関連因子の検索・同定

ゾウリムシに対する細胞毒性因子の検索・同定を行うために、毒性型レジオネラを用いた解析を行う。検索のためにトランスポゾンを用いた欠損株作成を行う。作成された毒性の低下した毒性型レジオネラを解析することにより、細胞毒性因子の同定を行う。その後、非毒性型レジオネラ株への細胞毒性因子導入による細胞毒性の増強を確認する。

#### (3)ヒトに対する新規病原性関連因子の検討

レジオネラ感染により、発熱・肺炎が引き起こされるが、詳細なメカニズムは解明されていない。そこで、1)と2)の研究により明らかになるゾウリムシに対する細胞毒性因子がヒトに対する病原因子になりうるか否かを確認する。ヒト由来細胞(HeLa細胞、THP-1細胞など)およびマウスを用い、病原因子と細胞傷害性および炎症性サイトカイン産生との関連を検討する。

#### (4)抵抗性ゾウリムシの解析

これまでの研究により、毒性型レジオネラに対して抵抗を示すゾウリムシ株を確認している。このことから、抵抗性ゾウリムシは毒性型レジオネラを含むすべての型のレジオネラを消化していることが示唆されたため、レジオネラの毒性に対するゾウリムシの抵抗システムの解明を行う。この研究により、より多くのレジオネラ株を制御することが可能となる。まず、抵抗性ゾウリムシ内で毒性型レジオネラが消化されているか否かを確認する。消化が確認された場合には、抵抗性ゾウリムシ内において、非抵抗性ゾウリムシと同じ消化システムが毒性型レジオネラに対して働いているのか確認する。ファゴソーム内のpH低下(酸性化)、ファゴソームとリソソームとの融合などを確認する。また、毒性型レジオネラが抵抗性ゾウリムシ内で、非毒性レジオネラ同様の回避システムを働かせているのかを確認する。これらの研究と合わせて、抵抗性と非抵抗性のレジオネラの比較により、抵抗性因子(=消化を可能とする因子)の検索・同定を行う。

#### (5)制御ゾウリムシの作成および環境モデルにおける制御テスト

上記までの研究により得られた成果を基盤とした制御用ゾウリムシ作成を目指す。これには、ゾウリムシの大核に遺伝子発現ベクターをマイクロインジェクションする方法を用いる。作成した制御用レジオネラが環境中において十分な制御を行えるか否かを環境モデルを用いて確認する。水槽を用いた簡

易環境ミニモデル内におけるレジオネラおよびゾウリムシの増減を確認する。比較対象として、ゾウリムシを入れない場合、他のゾウリムシを入れる場合などが考えられ、比較検討する。

#### (6)レジオネラ制御システムの一般化

上記までの研究結果を、種々のゾウリムシおよびレジオネラを用いて解析し、限定されないレジオネラ制御システムの構築を行う。バイオリソースプロジェクトの協力のもと、多くのゾウリムシ株におけるレジオネラの動態、ゾウリムシの反応の確認を行う。これにより、これまでの研究で確認された現象が一般的なものかを確認する。また、本研究で用いたゾウリムシ株よりもより有用な株(消化が早い、抵抗性が強い)の発見も期待される。本研究で構築した制御モデルを突破できるレジオネラが確認された場合、どのように突破しているのかを解析し、より良い制御システムの構築を行う。この過程で、新規の病原因子の発見も期待される。

### 4. 研究成果

#### (1)レジオネラとゾウリムシとの共生関係の解明に関して

共焦点レーザー顕微鏡を用いた実験により、共生を示す組み合わせの場合、レジオネラはゾウリムシ内において48時間後においてもファゴソーム内に観察することが出来た。一方で大腸菌はファゴサイトーシスにより消化されゾウリムシ内で減少していった。この結果から、レジオネラはゾウリムシ内において、ファゴソームから脱出することによってファゴサイトーシスを回避しているわけではないことが示唆された。次に、Texas Red-conjugated dextran および Cascade Blue-conjugated dextran を用いた研究により、共培養2時間後と24時間後において初期LCV(Legionella-containing vacuole)と後期LCVの割合が殆ど変化せず、約80%が初期LCVであることが認められた。これらの結果から、レジオネラはゾウリムシ内での共生と生存を、初期LCVから後期LCVへの転換を制御することにより可能としていることが示唆された。

#### (2)ゾウリムシに対する細胞毒性関連因子の検索・同定に関して

先行研究によりレジオネラ・フィラデルフィア-1株(基準株)と、ゾウリムシ・RB-1株の共生関係は明らかになっていたが、他の組み合わせの場合を明らかにするために、複数のレジオネラ株と複数のゾウリムシ株との共培養を行った結果、殆どの組み合わせにおいてゾウリムシへの細胞毒性が見られることはなかった。この結果は、自然環境においてゾウリムシがレジオネラの宿主に十分になりうることを示唆している。一方で、2株(A株、B株)のレジオネラは、RB-1株を

含む一部のゾウリムシに細胞毒性を示した。A株はB株より多くのゾウリムシ株に細胞毒性を示した。また、A株よりB株の方が強い細胞毒性を示すゾウリムシ株が認められた。これらの結果は、レジオネラとゾウリムシの両方の因子が両者の関係性に関連していることを示唆している。

細胞毒性因子を検索する過程において、細胞毒性を示すためには、生菌であること、侵入および増殖が必要であることが明らかになった。

トランスポゾンを用いたレジオネラ変異株の作成を試み、ゾウリムシへの細胞毒性の減弱若しくは消失した変異株を得ることが出来た。変異部の決定、および相補株の作成を行った。また、相補株が細胞毒性を有することを確認した。この結果から、ゾウリムシに対してレジオネラが細胞毒性を示すために必要な因子の一つを同定することが出来た。

(3)人に対する新規病原性関連因子の検討に関して

(2)で得られた変異株は、ヒトマクロファージ細胞株であるTHP-1細胞においても細胞内増殖性の有意な減弱が認められた。一方で、相補株は非欠損株と同等の細胞内増殖性を示した。これらの結果から、本研究で明らかにされたゾウリムシに対する細胞毒性因子は、ヒトの病原性関連因子でもある可能性が示唆された。

(4)抵抗性ゾウリムシの解析

LysoTrackerを用いたファゴソーム成熟化確認実験により、毒性型を示すレジオネラ(B株)とゾウリムシの組み合わせを用いた場合において、レジオネラ基準株、変異株、大腸菌を感染させた場合と比較し、LysoTracker陽性LCV率が著しく低減していた。この結果から、ゾウリムシはファゴソームの酸性化により菌を消化し、一方で毒性型レジオネラはファゴソーム成熟による酸性化を抑制し、ファゴソーム内で生存していることが示唆された。この知見は、抵抗性ゾウリムシの解析に関する基礎データとなる。

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 1 件)

Kenta Watanabe, Ryo Nakao, Masahiro Fujishima, Masato Tachibana, Takashi Shimizu, Masahisa Watarai. *Paramecium is a natural reservoir of Legionella pneumophila*. Scientific reports. 査読有、6、24322、2016.  
DOI: 10.1038/srep24322

〔学会発表〕(計 1 件)

渡邊 健太, 中尾 亮, 藤島 政博, 橘 理人, 清水 隆, 度会 雅久. Modulation of endosymbiosis by Legionella pneumophila in ciliate Paramecium. 第89回日本細菌学会総会. 2016年3月23日~25日. 大阪国際交流センター.

〔図書〕(計 1 件)

Masato Tachibana, Hiroshi Asakura, Masahisa Watarai. Nova Science Publishers, Inc. *Advances in Medicine and Biology*. Volume 97. 2016、12

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

橘 理人 (TACHIBANA, Masato)

国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・研究助手

研究者番号: 2063683

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

渡邊 健太 (WATANABE, Kenta)