

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590398

研究課題名（和文）宿主細胞内増殖性を喪失したレジオネラ強細胞毒性株による毒性発現機構の解明

研究課題名（英文）The clarification of mechanisms for cytotoxic effect of *Legionella* hyper-toxic mutants which are intracellular growth-deficient (Tox^h mutants) on host cells.

研究代表者

三宅 正紀 (MIYAKE MASAKI)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：00295560

研究成果の概要（和文）：*Legionella pneumophila* 野生株ゲノムへのランダムトランスポゾン挿入変異法により分離した、宿主細胞内増殖性を欠損しているにもかかわらず、高い細胞毒性を示す変異株（Tox^h 変異株）について、宿主感染性状及び毒性発現機構の解析、さらにその変異遺伝子・責任遺伝子の同定を行った。また、レジオネラ感染感受性の A/J マウスを用いた感染モデルにより、Tox^h 変異株の病原性評価を行った。

研究成果の概要（英文）：We have characterized of *Legionella pneumophila* hyper-toxic mutants which are intracellular growth-deficient (Tox^h mutants) for infectivity and cytotoxicity to host cells. And the chromosomal loci of mini-Tn10:kan-insertion in Tox^h mutants and a gene responsible for a phenotype of one of their mutants have identified. Furthermore, pathogenicity of Tox^h mutants were evaluated using A/J mice, which are susceptible to replicative *L. pneumophila* infections.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：*Legionella pneumophila*、宿主細胞内増殖、強細胞毒性、アポトーシス、マウス病原性

1. 研究開始当初の背景

レジオネラ症の原因病原体 *Legionella pneumophila* は、自然環境中ではアメーバなどの細菌捕食性原生動物、ヒト体内では肺マクロファージを感染宿主とする細胞内寄生細菌である。米国ケンタッキー大学 Yousef Abu Kwaik 博士（現レイビル大学所属）のグループは、アメーバ及びマクロファージ両宿主内増殖に必須な菌体因子及びマクロファ

ージ内増殖においてのみ必須な菌体因子を網羅的に探索する目的で、*L. pneumophila* 野生株である AA100 ゲノムにトランスポゾン mini-Tn10:kan をランダム挿入し、5280 株の挿入変異株を得た。そのうち、ヒトマクロファージ様 U937 細胞及び原生動物（自由生活アメーバ）*Acanthamoeba polyphaga* 両宿主細胞内における増殖性が低下した 89 株、U937 細胞内でのみ増殖性が低下した 32 株

の変異遺伝子を総称して、それぞれ *pmi* (protozoa and macrophage infectivity loci)、*mil* (macrophage specific infectivity loci) と命名した (*Infect. Immun.* 65 (11) 4738-4746, 1997)。研究代表者は、Abu Kwaik 教授と共同研究にて、*pmi* 及び *mil* 変異株群の感染性状・分子遺伝学解析を遂行しており、これまでに、*pmi* 変異株 GB112 の解析では、新規細胞内増殖菌体因子として PmiA を同定した。(*Infect. Immun.* 73 (10) 6272-6282, 2005)。上記研究プロジェクトを遂行していく中で、*pmi* 及び *mil* 変異株群において、感染細胞内での増殖性を完全に喪失しているにも関わらず、感染後経時的に細胞毒性を増加させ、24 時間後には野生株と同様に 90%以上の感染細胞に毒性を示す、これまでに報告がないユニークな株 (hyper-toxic mutants, Tox^h 変異株と命名) が 4 株存在することが判明した。

2. 研究の目的

本研究では、分離された 4 株の Tox^h 変異株が、感染宿主内で増殖しないにも関わらず、強毒性を示す特徴的な感染現象を詳細に解析すると共に、それに起因する責任遺伝子(因子)を同定し、その機能を明らかにすることにより、レジオネラ感染における宿主細胞毒性・細胞死の機構に関する新たな知見を見出し、その病原学的・生物学的意義を追究することを目的とした。

3. 研究の方法

レジオネラ株の細胞内増殖性試験は、U937 細胞及び *A. polyphaga* を使用して行った。レジオネラ株の細胞毒性試験は、U937 及び *A. polyphaga* に対して、それぞれ Alamar Blue 及び Trypan Blue を用いて行った。レジオネラ感染細胞における特異的細胞内小器官リクルートメントは、細胞内小器官マーカーとして抗 LAMP-2 抗体及び抗 KDEL 抗体、また、抗 *L. pneumophila* 抗体及び核染色試薬 TO-PRO-3 を用いて、共焦点レーザー走査型顕微鏡 LSM-510 (Carl Zeiss) にて評価した。レジオネラ感染細胞におけるアポトーシス誘導については、核の DNA 断片化を TUNEL 法により、また、caspase-3 発現を抗 caspase-3 抗体にて検出し、LSM-510 を使用して評価した。レジオネラ感染細胞の高解像度な形態観察は、透過型電子顕微鏡 JEM1010 (日本電子) を使用して行った。レジオネラ株のエフェクターの宿主細胞内送達能は、エフェクター RalF の百日咳菌アデニル酸シクラーゼ Cya との融合タンパク質を発現する各レジオネラ株を作製し、Cya レポーターアッセイにて評価した。Tox^h 変異株ゲノム上の mini-Tn10:kan 挿入部位は、mini-Tn10:kan を含むゲノム DNA

断片をプラスミド pBCSK+ベクターにクローニングし、あるいは、mini-Tn10:kan の半領域をセルフライゲーションし、これらを鋳型 DNA としたユニバーサルプライマー (T3) あるいは IS10 特異的プライマーによるシーケンス解析にて、同定した。レジオネラ株の病原性は、A/J マウスを用いた経気道感染モデル系におけるマウス生存性を指標に評価した。

4. 研究成果

(1) Tox^h 変異株を U937 に感染させ、感染早期における後期エンドソーム-リソソームマーカーである LAMP-2 及び小胞体保留シグナル KDEL 保有タンパク質の菌含有ファゴソームへの集積性を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。Tox^h 変異株を含むファゴソームは、LAMP-2 との共局在率は低い一方、KDEL シグナルとの共局在率は高いことが明らかとなった。このことは、Tox^h 変異株は、野生株と同様に、自身を含むファゴソームに対してリソソームの融合を阻害し、小胞体タンパク質を周囲に集積させることを示唆した。また、Tox^h 変異株感染細胞の透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、菌含有ファゴソームへの輸送小胞、ミトコンドリア、小胞体の接近、ファゴソーム膜へのリボソームの配列が観察され、野生株感染時にみられる特殊なファゴソーム (Legionella-containing vacuole, LCV) に類似したファゴソームが形成されていることが分かった。さらに、宿主細胞内小器官の *Lp* 感染特異的なリクルートメントに関わるエフェクター RalF の宿主細胞内への送達について、RalF と Cya との融合タンパク質 (Cya-RalF) を発現する Tox^h 変異株を構築し、その宿主感染において、Cya-RalF が Icm/Dot 分泌装置により宿主内へ輸送された時のみ細胞内 cAMP の産生が誘導されることを利用して、Tox^h 変異株のエフェクター輸送能を調べた。その結果、Tox^h 変異株の感染では、細胞内 cAMP の産生増加が見られ、RalF が宿主細胞内へ送達されることが示された。これらの結果より、Tox^h 変異株が、野生株と同様に、Icm/Dot を介したエフェクターの作用を介して、感染細胞内で LCV 様ファゴソームを形成することが推測された。

(2) 一方、(1) の Tox^h 変異株感染 U937 細胞の電子顕微鏡観察において、宿主細胞に対する毒性がピロトーシス誘導に起因することを疑う形態学的な所見は特に見つけられなかった。また、これら変異株は、野生株と同様に、U937 細胞内で、エフェクターを送達することにより、LCV と形態的に類似した小胞を形成し、その中に留まる上記結果も踏まえて、次に、Tox^h 変異株感染時の細胞毒性が、

野生株と同様に、アポトーシスに起因する可能性を、共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて検証した。その結果、感染 4 時間後に、宿主細胞の caspase-3 の活性化、感染 10 時間以降に、核の断片化が観察され、Tox^h 変異株が、野生株と同様に、宿主細胞にアポトーシスによる細胞死を誘導することが分かった。一般に、IV 型分泌装置 Icm/Dot 変異株などこれまで知られている多くの細胞内増殖性変異株による宿主感染では、LCV は形成されず、また、宿主に対する細胞毒性、細胞死を誘導しない。本研究において、Tox^h 変異株が、エフェクターの宿主内輸送性を保持し、野性株感染時と類似の LCV を形成するにもかかわらず、細胞内増殖性を欠損する一方で、野生株と同様にアポトーシスを誘導することで、宿主細胞に対して、高い細胞毒性を有することが示され、当該変異株がこれまでに報告例がない特異な性状を持つ細胞内増殖性欠損株であることが明らかとなった。

(3) 4 株の Tox^h 変異株について、そのゲノム上における mini-Tn10:kan 挿入部位を決定した (変異遺伝子部位については、論文発表前であることから、現時点では非公表とする)。3 株については、これまでに機能の一部が公表されている既知遺伝子内であったが、1 株については、機能未知遺伝子内であった。この機能未知遺伝子内に mini-Tn10:kan の挿入をもつ Tox^h 変異株・GS147 に着目し、その変異遺伝子を M45 エピトープタグとの融合タンパク質として発現するプラスミドを導入し、相補株を作製した。当該相補株の細胞内増殖性を、U937 細胞を用いて評価したところ、遺伝子変異により喪失していた細胞内増殖性が、野生株と同程度に回復した。よって、GS147 株の特異的な性状に関わる責任遺伝子は、本遺伝子であることが示された。また、本遺伝子がコードするタンパク質 (A とする) について、ペプチド抗体を作製し、その発現様式をウェスタンブロッティングにて解析した。その結果、タンパク質 A は、*in vitro* 培養においては、一切発現がみられない一方、菌を U937 細胞及び自由生活アメーバ *A. polyphaga* に感染させ、これら宿主細胞内に取り込ませたと、双方の細胞内でその発現が確認された。このことから、タンパク質 A は、菌が宿主細胞内環境に暴露された時にのみ発現する極めて特徴的な発現様式をもつことが明らかとなった。さらに、GS147 株の病原性をマウス感染系にて評価した。*Lp* 感染に感受性の高い A/J マウスを用いて、菌を経気道的に感染させたところ、GS147 株と同様に宿主細胞内増殖性を欠損する IV 型分泌装置変異株 LELA3118 感染では、感染後 1 週間経過した時点においても感染マウス 5 匹中死亡するマウスは 0 匹であったが、GS147

株及び野生株感染では、共に菌感染一日後に、5 匹の感染マウス全てが死亡した。よって、Tox^h 変異株 GS147 は、野生株と同様なマウス病原性を保持していることが明らかとなった。

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 3 件)

① Toshihiko Harada, Takashi Tanikawa, Yasunori Iwasaki, Masao Yamada, Yasuyuki Imai, Masaki Miyake: Phagocytic entry of *Legionella pneumophila* into macrophages through phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate-independent pathway.

Biol. Pharm. Bull., 35, 1460–1468 (2012)

DOI: 10.1248/bpb.b11-00011

② Fuhito Hojo, Daisuke Sato, Junji Matsuo, Masaki Miyake, Shinji Nakamura, Miyuki Kunichika, Yasuhiro Hayashi, Mitsutaka Yoshida, Kaori Takahashi, Hiromu Takemura, Shigeru Kamiya and Hiroyuki Yamaguchi: Ciliates expel environmental *Legionella*-laden pellets to stockpile food.

Appl. Environ. Microbiol., 78, 5247–5257 (2012)

DOI: 10.1128/AEM.00421-12

③ Tsuyoshi Hayashi, Masahiro Nakamichi, Hirotaka Naitou, Norio Ohashi, Yasuyuki Imai, Masaki Miyake: Proteomic analysis of growth phase-dependent expression of *Legionella pneumophila* proteins which involves regulation of bacterial virulence traits.

PLoS One, 5, e11718 (2010)

DOI: 10.1371/journal.pone.0011718

[学会発表] (計 14 件)

① 三宅 正紀、山田 雅音、東 真結実、関 俊哲、今井 康之

茶カテキン類のレジオネラに対する殺菌・増殖抑制作用

日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 30 日、横浜

② 若井 翔平、三宅 正紀、小田 祐一、Yousef Abu Kwaik、今井 康之

レジオネラの IV 型分泌系の機能に影響する新規遺伝子の同定

日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2012、2012 年 11 月 18 日、岐阜

③ 三宅 正紀

宿主細胞内増殖性を欠損したレジオネラ強細胞毒性変異株 (Tox^h変異株) の性状解析
US フォーラム 2012、2012年9月25日、静岡

④ 三宅 正紀

茶カテキン類のレジオネラ感染成立に及ぼす影響及び感染阻害剤としての有用性に関する研究
US フォーラム 2012、2012年9月25日、静岡

⑤ 三宅 正紀、原田 俊彦、岩崎 泰憲、山田 雅音、今井 康之

活性酸素産生系の活性化を伴わない *Legionella pneumophila* のマクロファージ侵入について
第24回微生物シンポジウム、2012年9月3-4日、大阪

⑥ 北条 史、佐藤 大祐、三宅 正紀、松尾 淳司、中村 眞二、神谷 茂、山口 博之

繊毛虫が放出する環境レジオネラを包含した小胞ペレットは繊毛虫の生存を支える備蓄栄養源として機能している
第79回日本細菌学会北海道支部学術総会、2012年8月28-29日、帯広

⑦ 山田 雅音、今井 康之、三宅 正紀

茶カテキンのレジオネラに対する殺菌・増殖抑制効果の検証
第85回日本細菌学会総会、2012年3月28日、長崎

⑧ 三宅 正紀、今井 康之

レジオネラの宿主内増殖に関する菌体タンパク質 PmiA の機能解明
平成23年度中部乳酸菌研究会、平成23年11月25日、新潟

⑨ 山田 雅音、東 真結実、三宅 正紀、今井 康之

茶カテキンのレジオネラ生存性及び増殖性に及ぼす影響
日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2011、2011年11月23日、名古屋

⑩ Masaki Miyake, Ippei Yoshida, Minami Yamamoto, Ayumi Sugiyama, Yoshihiro Akimoto, Hayato Kawakami, Yousef Abu Kwaik, Yasuyuki Imai
Characterization of *Legionella* hyper-toxic mutants which are intracellular growth-deficient (Tox^h mutants) for

infectivity to host cells.

International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011)、7 September 2011、Sapporo、Japan

⑪ 三宅 正紀、吉田 一平、山本 みな実、杉山 亜由美、秋元 義弘、川上 速人、Yousef Abu Kwaik、今井 康之

細胞内増殖性を欠損したレジオネラ強細胞毒性株の性状解析
第23回微生物シンポジウム、2010年9月2日、銚子

⑫ 小田 祐一、若井 翔平、Yousef Abu Kwaik、今井 康之、三宅 正紀

IV型分泌装置 Icm/dot コード領域以外の変異により宿主内へのエフェクター送達が阻害されるレジオネラ細胞内増殖性欠損株について
日本薬学会第131年会、2011年3月30日、静岡

⑬ 三宅 正紀、林豪士、中道 正浩、内藤 博敬、大橋 典男、今井 康之

レジオネラの病原性状の制御に関する増殖相依存的タンパク質のプロテオーム解析
日本薬学会第131年会、2011年3月30日、静岡

⑭ 三宅 正紀、岩崎 泰憲、林 豪士、Yousef Abu Kwaik、今井 康之

レジオネラ膜タンパク質 PmiA はIV型分泌装置 Icm/Dot 構成因子 DotA の安定化を担う
第22回微生物シンポジウム、2010年9月4日、大阪

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0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0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

三宅 正紀 (MIYAKE MASAKI)
静岡県立大学・薬学部・講師
研究者番号：00295560

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：