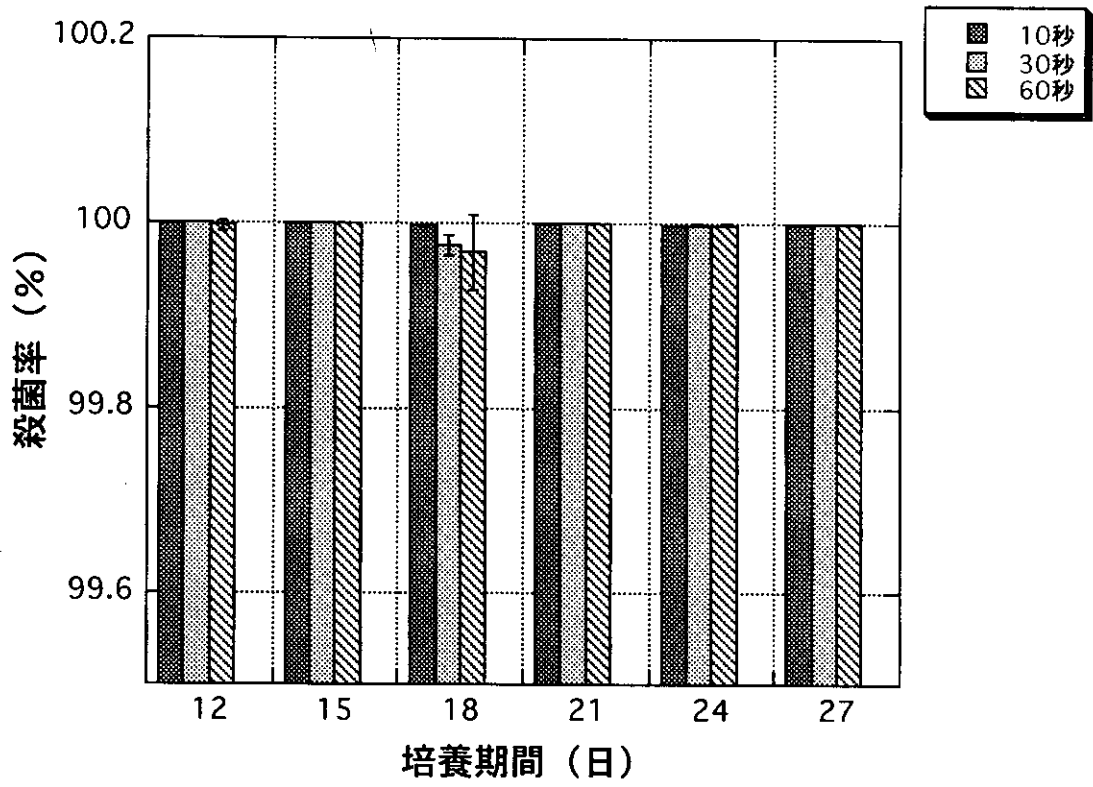


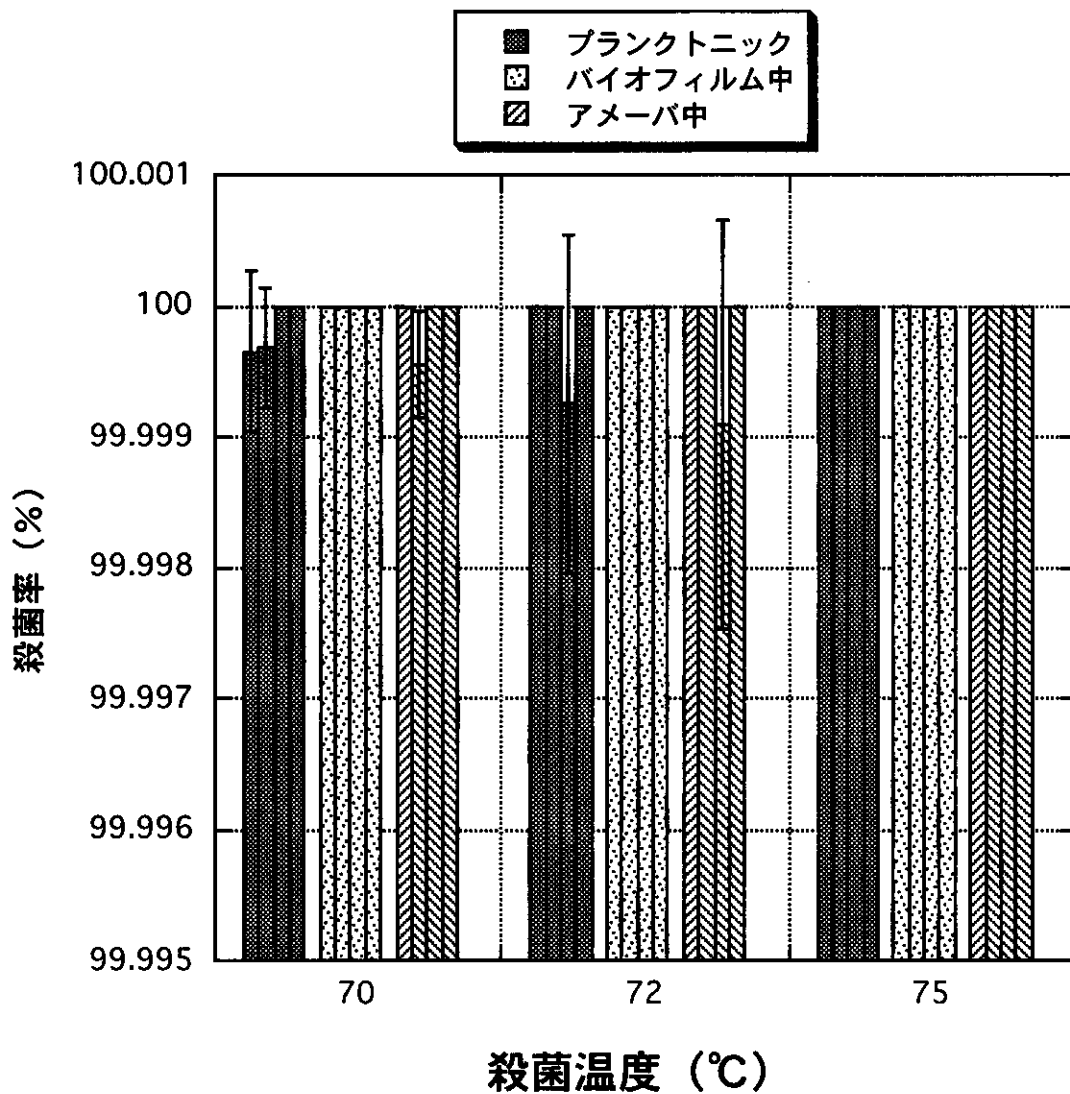
図2：バイオフィルムに対する熱殺菌効果



II. 70℃～75℃熱殺菌効果の検討

以上の検討で、18日間培養で形成されたバイオフィルムの熱耐性が最も高いと認められ、その条件のバイオフィルムとその他の増殖形式に対する熱殺菌効果を三度行い、以下の結果を得た。

図3：各増殖形式に対する平均熱殺菌効果
(殺菌時間 10秒、30秒、1分、3分)



III. 70℃、75℃熱殺菌検討結果の統合

生物学的系統で起こりうる分散が各実験の結果に表れているため、全体的な比較がしにくいと考え、各実験での70℃、75℃加熱殺菌率の結果をまとめ、平均した。

表1：70℃、75℃加熱殺菌率の統合平均

殺菌温度 (℃)	殺菌時間 (秒)	殺菌率 (平均±SD%)		
		プランクトニック	バイオフィーム中	アメーバ中
70	10	99.99965±0.00061	99.99874±0.00185	100±0
70	30	99.99968±0.00046	99.99012±0.01465	99.99955±0.00041
70	60	100±0	99.93963±0.14650	100±0
70	180	100±0	99.97682±0.05678	100±0
70	300	100±0	99.98182±0.03149	100±0
75	10	100±0	100±0	100±0
75	30	100±0	100±0	100±0
75	60	100±0	100±0	100±0
75	180	100±0	100±0	100±0
75	300	100±0	100±0	100±0

註：100±0（小数点無）は「完全殺菌」を指す。

考察

(1) バイオフィーム中のレジオネラの熱耐性は、プランクトニック形式、アメーバ中のと比べ、最も高いと見える。

(2) 70℃で熱殺菌を行った場合、殺菌効果は完全である場合もあり、不完全な場合もある。

(3) 72℃で熱殺菌を行った場合、ほぼ完全に殺菌されているが、稀に不完全である状況も生じた。

(4) 75℃で熱殺菌を行った場合、殺菌効果は完全である。

(5) 殺菌時間依存性は無いと見える。

第二段階結論

(1) 一貫の完全殺菌が目標ならば、75℃殺菌が妥当である。

(2) 殺菌時間は10秒まで短縮しても妥当である。

2. レジオネラの病原性に関する研究

レジオネラ肺炎原因菌とポンティアック熱原因菌の比較研究

産業医科大学 宮本比呂志 石松維世 谷口初美

研究概要

レジオネラのエアロゾル曝露実験系を考案し、モルモットを使用して肺炎原因菌株とポンティアック熱原因菌株の感染実験を行なった。臨床症状、肺組織所見などを肺炎原因菌株とポンティアック熱原因菌株で比較した結果、ポンティアック熱原因菌も肺炎を引き起こす病原性を持っていることが明らかになった。この知見はポンティアック熱がレジオネラ死菌や弱毒菌によるレジオネラ感染症ではないことを示唆している。

研究目的

レジオネラ症には肺炎型（レジオネラ肺炎）と非肺炎型（ポンティアック熱）の2つの病態（病型）がある。ポンティアック熱は発熱、筋肉痛、全身倦怠感、咽頭痛、咳などを呈するインフルエンザ様の疾患であり、肺炎を発症せずに自然治癒する。潜伏期が36～48時間と短く、侵襲率が95%に達することも肺炎型（レジオネラ肺炎の侵襲率は30%以下）と著しく異なっている。同一菌種が、なぜ異なった病態をとるのかについて現在までにいくつかの仮説（死菌感染説、弱毒菌感染説、レジオネラ捕食アメーバ吸入によるアメーバ過敏症説）が提唱されてきた。しかしながら、死菌感染説では感染源から多数の生菌が分離されることが説明不可能であり、弱毒菌感染説では高い侵襲率が、アメーバ過敏症説では肺炎を起こさないことがそれぞれ説明できず、異なる病態をとる理由は明らかでない。そこでこの病型決定因子を細菌側から明らかにするため、レジオネラ肺炎原因菌とポンティアック熱原因菌の比較研究を行った。

材料と方法

細菌；レジオネラ肺炎原因菌株として *Legionella pneumophila* Philadelphia-1（血清群1）を使用した。ポンティアック熱原因菌としては、1995年の本邦初のポンティアック熱集団発生の際に原因菌として空調冷却塔水より分離された *L. pneumophila* EY3698（血清群7）を用いた。

細胞内増殖試験（in vitro）；semi-confluent に増殖した 咽頭上皮由来細胞株

(HEp-2)に、37°Cで培養した上記の菌株を各々 MOI=10 で感染させた。3時間感染させた後、PBS で monolayer を洗浄して未感染の菌を除き、経時的に BCYE 寒天培地に接種して生菌数を求めた。モルモット肺胞マクロファージはアンピシリンおよびストレプトマイシン含有 RPMI1640 培地を使用して採取した。monolayer を調整した後、菌株を各々 MOI=10 で感染させた。1時間30分食菌させた後、PBS で monolayer を洗浄して未感染の菌を除き、経時的に BCYE 寒天培地に接種して生菌数を求めた。

吸入曝露実験；概略を図1に示した。10⁶~10¹⁰ CFU/ml に調整した菌液（エアロゾル発生原液）より超音波ネブライザーを使用してエアロゾルを発生させた。曝露チャンパー内のエアロゾル濃度が均一に保たれるよう吸引流量と排気流量を調節した後、このエアロゾルをガラス製代謝チャンパー（曝露チャンパー）内に吸引して無麻酔の200~300グラムの Hartley 系モルモット（雄）に15分間吸入させた（図2）。曝露終了後、感染モルモットの直腸温、体重、肺内菌数、HE 染色による肺組織像の観察を経時的に行った。また、モルモットへの曝露菌数を知るため、曝露実験終了後に曝露状態を再現し、チャンパー内のエアロゾルをインピンジャーに液体捕集した（図3）。これにより曝露チャンパー内の単位空気あたりの菌数を測定し、モルモット呼吸量より実験ごとに曝露菌数を求めた。なお、本実験は産業医科大学動物実験倫理委員会の承認のもとに行われた（承認番号99-014）。

結果

細胞への付着・侵入と細胞内増殖

ポンティアック熱原因菌株の HEp-2 細胞への付着・侵入能は肺炎原因菌株に比べ約1000倍高かった（図4A）。しかし、肺胞マクロファージへの感染率には両菌株間で差が無く、また、両菌株とも細胞内で増殖した（図4B）。

吸入曝露実験系における感染菌量と致死菌量

レジオネラ吸入曝露実験系を確立するため、肺炎原因菌株である Philadelphia-1 株を使用して、モルモットへの感染菌量(infectious dose)と致死菌量(leathal dose)を発熱と生死を指標にして調べた。表1に示すように肺炎原因菌株のモルモットに対する感染菌量は 7.1x10²CFU 以下であり、100%致死量は 5.9x10⁶CFU であった。これらの菌数は曝露2時間後の肺内菌数であるが、モルモット呼吸量より計算される推定曝露菌数の50%~120%であ

った。致死菌数以下(sublethal dose) の感染ではモルモットは2日後より発熱し、5日間の発熱と体重の減少が観察された(図5)。感染4日後の肺組織光顕像で肺炎が確認された。しかし、同菌株の加熱死菌(推定曝露菌数; 5.8×10^4 CFU) を曝露させたモルモットでは発熱も体重減少も認めず(図5)、組織学的にも肺炎を認めなかった。

ポンティアック熱原因菌を使用した曝露実験

ポンティアック熱原因菌 (*L. pneumophila* EY3698) を吸入曝露させたモルモットでは1°C程度の発熱を認めた(図6A)。しかしながら、感染4日後の肺組織像で肺炎が観察された。EY3698 株の人工培地上での継代による弱毒化の可能性を除外するため、本菌株をモルモット腹腔内に投与し、3日後の脾臓より回収した菌株 (*L. pneumophila* EY3698/GPS) を使用して、曝露実験を行った。EY3698/GPS 株を吸入させたモルモットは肺炎原因菌株 (Philadelphia-1 株) と同程度の発熱、体重減少を認めた(図6A)。肺内菌数も感染4日後には曝露直後の10000倍に増殖しており(図6B)、組織学的にも肺炎が観察された(図7)。また、ポンティアック熱原因菌株を曝露させた場合の曝露2時間後の肺内菌数はモルモット呼吸量より計算される推定曝露菌数の45%~110%であり、肺炎原因菌株を曝露させた場合(50%~120%)と変わらなかった。

考察

in vitro の実験で、ポンティアック熱原因菌株は肺炎原因菌株より咽頭上皮由来細胞株への感染率が高いことが明らかになった。そこで、ポンティアック熱をレジオネラによる上気道炎と捉えることが可能ではないかと考え、この仮説を確かめるためレジオネラの吸入曝露実験系を考案した。その結果、(1) 肺内菌数と推定曝露菌数の違いより推測される上気道への菌の定着に両菌株間で違いがないこと(2) ポンティアック熱原因菌株も肺炎原因菌株と同様に致死性の肺炎を引き起こし、感染菌量も致死量も両菌株間で有意な差はないこと(未発表データ)(3) レジオネラ死菌曝露では発熱も体重減少も認めないことが明らかとなった。これらの知見はポンティアック熱をレジオネラ感染による上気道炎と捉えることには無理があること、及びポンティアック熱がレジオネラ死菌や弱毒菌によるレジオネラ症ではないことを示唆している。

今回の研究においては両菌株の病原性に違いを認めなかったが、*L.*

pneumophila の病原性は温度や鉄濃度で変わることが報告されている。今後これらの菌株の分離された環境の温度や鉄濃度なども考慮に入れた菌側からのアプローチが同一菌種による病型の違いを解明するために必要と考えられる。また、環境水中のレジオネラには人工培地では発育できないが生きている (viable but nonculturable) 生理状態の菌株が存在している。このような状態の菌株は適当な細菌捕食性原虫 (*Acanthamoeba polyphaga* など) と co-cultivation すると人工培地で発育できるようになることが知られている。Fallon と Rowbotham は 1988 年のポンティアック熱の集団発生の際、渦流浴水と *A. polyphaga* を co-cultivation することにより viable but nonculturable な *Legionella micdadei* を人工培地で分離し、原因菌と同定した。viable but nonculturable な生理状態の菌株にも病原性があり、ポンティアック熱を起こしている可能性があるため、このような生理状態の菌株の病原性の研究も必要であろう。

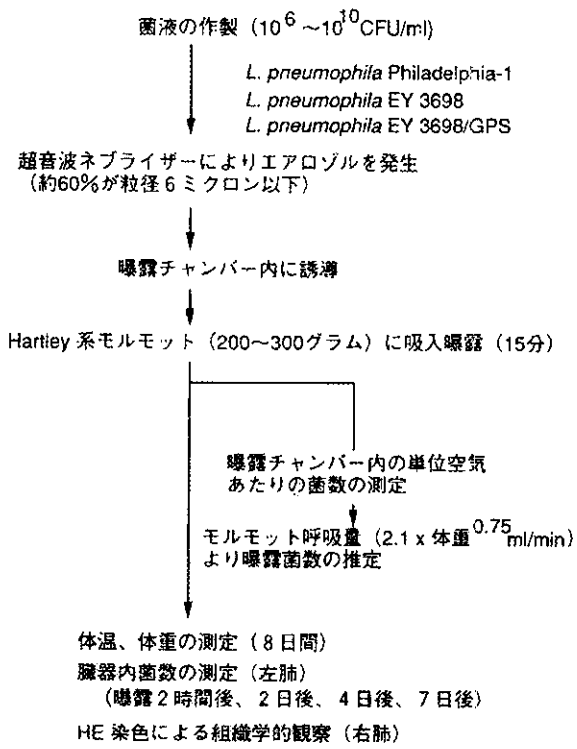


図 1

L. pneumophila の細胞内増殖 (in vitro)

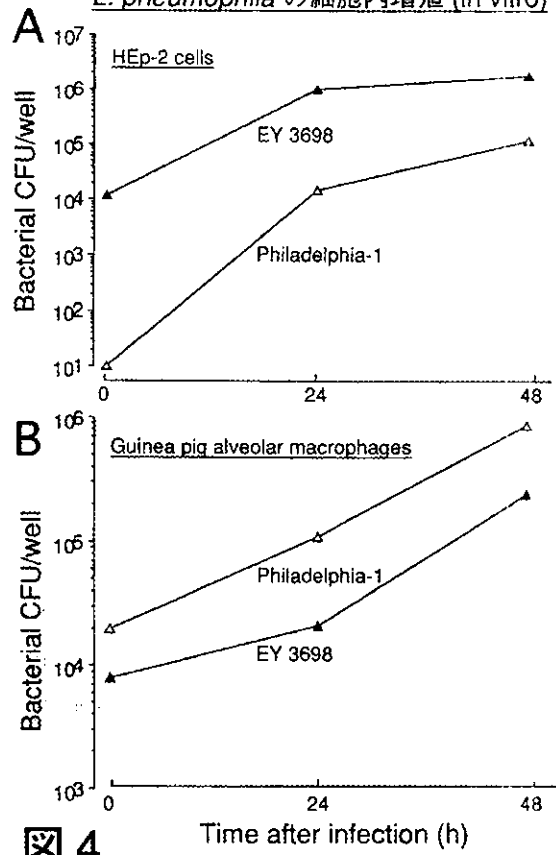


図 4



図 2

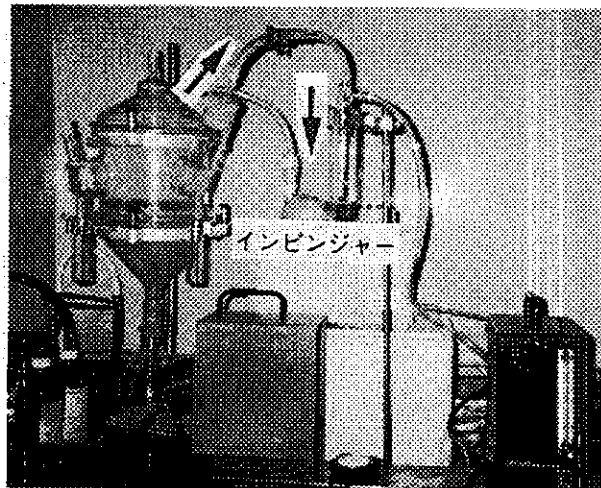


図 3

表 1

モルモットへの infectious dose と lethal dose
(*L. pneumophila* Philadelphia-1)

肺内菌数[CFU/lungs] (曝露 2 時間後)	No. dead / total	No. febrile / total
7.1×10^2	0 / 2	2 / 2
6.3×10^3	0 / 2	2 / 2
1.4×10^4	0 / 2	2 / 2
1.6×10^5	0 / 2	2 / 2
5.9×10^6	2 / 2	2 / 2

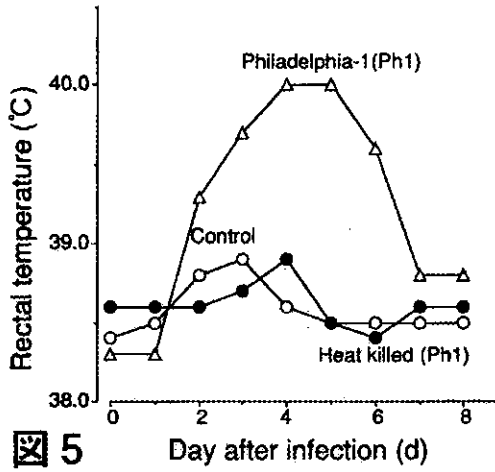


図 5

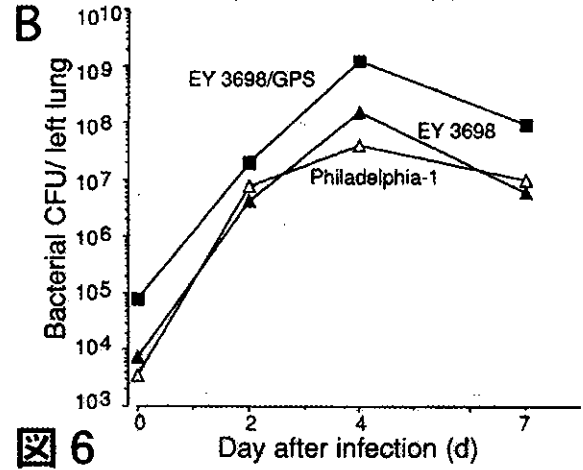
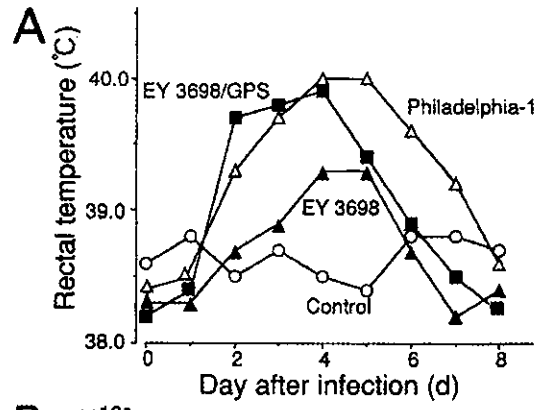


図 6

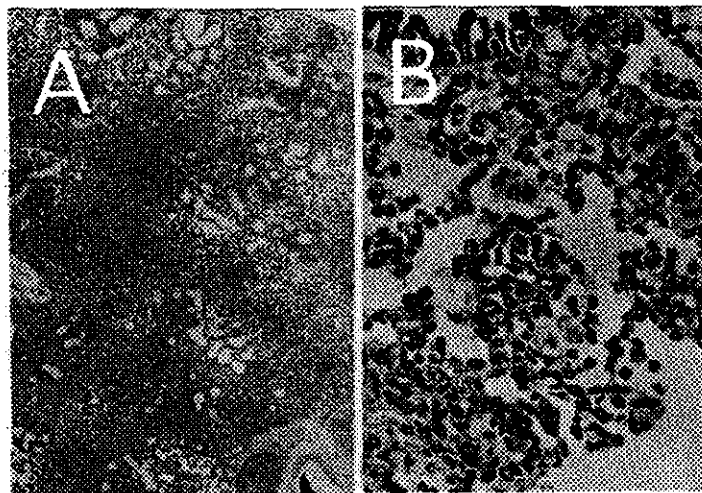


図 7

Legionella dumoffii の DjIA タンパク (DnaJ タンパクファミリーの一つ) は細胞内増殖に必要である

九州大学大学院医学研究院細菌学分野 大西裕子 吉田眞一

<要約>

Legionella dumoffii は在郷軍人病の原因菌の一つである。*L. pneumophila* では、マクロファージ内で増殖できることが病原性において大変重要であることがわかっている。一方 *L. dumoffii* は、マクロファージ内で増殖できることのみ報告されている。我々は、*L. dumoffii* の細胞内増殖機構をさらに深く理解するために、トランスポゾン挿入変異株の中から細胞内増殖できない変異株を分離することを試みた。790 株のトランスポゾン挿入変異株をスクリーニングした結果、我々は 4 株の細胞内増殖できない、または、低下した変異株を得た。4 株の細胞内増殖低下変異株のうち、2 株は *L. pneumophila* において細胞内増殖に必須であると言われている *dot/icm* 遺伝子群内の *icmB* 及び *dotC* と相同性のある遺伝子にトランスポゾンの挿入があることが示された。また、細胞内増殖低下変異株の 1 株は、*djIA* 遺伝子 (*dnaJ*-like Δ 遺伝子) に変異が認められた。*DjIA* タンパクは *DnaJ/Hsp40* タンパクファミリーの一員である。共焦点蛍光レーザー顕微鏡下で観察した結果、野生株の場合と異なり、*L. dumoffii* の *djIA* 変異株を感染させたマクロファージのファゴソームは後期エンドソーム・リソソームマーカーである Lysosomal membrane protein-1 (LAMP-1) 及び LAMP-2 と局在が一致した。これより、この変異株はファゴソーム・リソソーム融合阻害ができないことが示唆された。透過型電子顕微鏡下では、*L. dumoffii* *DjIA* 変異株は、野生株と異なり、宿主細胞の粗面小胞体を周囲に集めることができないことが観察された。さらに、*L. dumoffii* の *DjIA* 変異株は過酸化水素、高浸透圧、及び、高温のストレスに対して、野生株に比較し、高い感受性を示した。これらの結果より、*L. dumoffii* の *DjIA* タンパクは、細胞内増殖及び細胞内小器官の移送だけでなく、細胞外環境ストレスに対する菌の抵抗性にも必要であることが示唆された。この報告は、*DjIA* 遺伝子単独欠損変異株が明確な表現型を示すことを述べた最初の報告である。

<序論>

L. dumoffii は 1979 年冷却塔水より初めて分離され、その後、同年、剖検肺より非典型的レジオネラ様細菌として分離された。後に Brenner によってレジオネラ属の第 4 の新菌種として *Legionella dumoffii* と命名された。レジオネラ属菌はグラム陰性菌であり、自然界では、淡水アメーバに寄生する通性細胞内寄生菌である。そして、偶発的にヒトへ感染し、肺胞マクロファージや肺胞上皮細胞内で増殖することができる。在郷軍人病の原因菌として最も一般的な菌種は、*L. pneumophila* である。ヒトは、主に、汚染された環境からレジオネラを含んだエアロゾルを吸入することにより感染する。肺胞マクロファージ内に取り込まれた後、*L. pneumophila* を含むファゴソームは酸性化を逃れるだけでなく、リソソームとの融合も行わない。その代わりに、ミトコンドリア、滑面小胞体、粗面小胞体などが、*L. pneumophila* を中に含む小胞の周囲に配され、その後、*L. pneumophila* はこの独特の住処の中で、増殖を開始する。このような変化したエンドサイトーシスの経路は *Dot/Icm* タイプ 4 分泌機構によって制御されていると考えられている。*Dot/Icm* 遺伝子群は *L. pneumophila* の細胞内増殖に不可欠である。これまで、レジオネラ属菌の数菌種において *Dot/Icm* 遺伝子群の存在が、サザンハイブリダイゼーションあるいは PCR 法によって示されている。しかしながら、*L. pneumophila* 以外の菌種の病原性への *Dot/Icm* 遺伝子群の寄与については未知である。

L. dumoffii は在郷軍人病の原因菌として 4 番目あるいは 5 番目に分離頻度が高い。*L. pneumophila* の病原性を促進する、鞭毛やカタラーゼやゲラチナーゼのような、タンパクあるいは要素のいくつかは *L. dumoffii* にも存在することがわかっている。リパーゼ、オキシダーゼ、亜鉛メタロプロテアーゼのような、いくつかの潜在的な病原因子は *L. dumoffii* には存在しない。

L. dumoffii が Vero 細胞やヒト肺胞上皮細胞の細胞系である A549 細胞に感染し増殖可能であることは報告されている。*L. dumoffii* の細胞内増殖の分子機構を解明するために、トランスポゾン変異誘発を用い、ほ乳類細胞内で増殖低下を示す変異株を分離することを試みた。790 株のトランスポゾン 903dIIIacZ 挿入変異株をスクリーニングした結果、我々は、J774 マウスマクロファージ細胞と A549 ヒトタイプ 2 肺胞上皮細胞内で、増殖と病原性の低下した 4 株を分離した。4 株中 2 株のトランスポゾン挿入周囲の塩基配列は *L. pneumophila* の *IcmB* 及び *DotC* に相同性のあるタンパクをコードしていた。また、3 番目の遺伝子がコードする推定上のタンパクは *DjIA* タンパクと相同性を示した。*DjIA* 相同タンパク、*DnaJ/Hsp40* タンパクファミリー群の一つは、最初大腸菌において推定上のオープンリーディングフレームの産物として同定された。その後、*DjIA* に相同なタンパクは、*Coxiella burnetti*, *Salmonella typhimurium*,

Klebsiella pneumoniae and *Vibrio cholerae* などの多くの他の菌種でも同定された。DjlA は DnaJ/Hsp40 タンパクファミリー群に特徴的な J-domain と呼ばれる領域を保有している。J-domain は、Hsp70 相同体 DnaK の ATPase 領域と相互作用することにより DnaK の ATPase 活性を活性化するのに不可欠となる。また、DjlA の過剰産生はコラン酸莢膜の産生を亢進する。また、DjlA の欠損変異株の解析によって、DjlA 遺伝子が生育に不可欠ではないことが示された。DjlA の相同タンパクは、*L. pneumophila* にも存在しているが、その病原性における役割については未知である。

この論文で、我々はマクロファージ内で、djlA 遺伝子がリソソームとの融合阻害や、細胞内小器官の移送に役割を果たしていることを報告する。また、DjlA は、過酸化水素や高温、高浸透圧のような環境ストレスに対する菌の抵抗性にも役割を担っていることを報告する。

<材料と方法>

菌株・プラスミド・培養

本実験に用いた菌株とプラスミドは Table 1 に掲載している。*L. dumoffii* Tex-KL 株とその派生株は BCYE (buffered charcoal yeast extract) 寒天平板培地上、あるいは BYE (buffered yeast extract) 液体培地で培養した。BYE は BCYE の作成法に準じ、charcoal と agar を除いた。*E. coli* の DH5 α 株 (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) はクローニングの実験操作の大半で使用した。必要な場合、抗生物質を以下の濃度で添加した。*L. dumoffii* に対してカナマイシン(KM) 30ug/ml、クロラムフェニコール (CM)15ug/ml 又は 20ug/ml。*E. coli* に対して KM 30ug/ml、アンピシリン(AMP) 50ug/ml、CM 20ug/ml。

細胞培養

J774A.1(JCRB9108)はマウスマクロファージ細胞系に由来する。A549 (JCRB0076)細胞系は、大阪にある健康科学研究財団に保管されていたもので、ヒト肺胞上皮癌より樹立され、分化したタイプ2肺胞上皮細胞の特徴を持つ。J774 細胞及び A549 細胞は 10% 胎児ウシ血清を添加した RPMI 1640 培養液内で培養した。

DNA 操作

制限酵素と T4 DNA ポリメラーゼはタカラ (京都、日本) より購入した。仔牛小腸由来アルカリ性フォスファターゼ(CIP)は Biolab より購入した。PCR 反応に用いる The Ready to Go PCR-Beads は Amersham Pharmacia Biotech より購入した。PCR 増幅反応に用いるためのオリゴヌクレオチドは Japan flour 会社より購入した。プラスミド DNA は the wizard plus miniprep あるいは、アルカリ溶解法を用いて *E. coli* 及び *L. dumoffii* から抽出した。*L. dumoffii* の染色体 DNA は Genomic Prep Cell and Tissue DNA Isolation Kit を用いて精製した。遺伝子導入法は Bio-Rad Gene Pulser を用いて行った。サブクローニングやラベリングのためにアガロースゲルより DNA 断片を精製する際には GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。

トランスポゾン変異導入と貯蔵変異株の作成

L. dumoffii は Tn903 の派生物である Tn903dIIIacZ を用いて変異導入した。Tn903dIIIacZ はカナマイシン耐性遺伝子と 5'末端が切られた lacZ 遺伝子を持っている。簡潔に言えば、Tn903lacZ を中に持つプラスミド pLAW330 をエレクトロポレーションした後、菌を BYE 内で 37℃、5時間培養し、カナマイシン含有 BCYE 培地上にプレートした。カナマイシン耐性 β ガラクトシダーゼ活性を持つ形質転換細胞を青色コロニーとして認識するために、0.6mg/ml の X-gal を含む 0.8% agar をカナマイシン含有 BCYE プレート上に塗りつけた。カナマイシン耐性、クロラムフェニコール感受性のコロニーを *L. dumoffii* の単一のトランスポゾン Tn903dIIIacZ 挿入変異株として保存した。

サザンハイブリダイゼーション

L. dumoffii の染色体 DNA を HindIII 制限酵素で切断し、TBE buffer で作成した 0.7%アガロースゲルに溶解し、ナイロン膜に移した。DNA プローブはジゴキシゲニン-11-dUTP で任意に標識を与える方法を用いて準備した。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、洗浄条件は Molecular cloning 3rd edition に記載されていると同様の方法で行い、核酸のハイブリッド形成の比色同定法は DIG system (Roche Diagnostic)を用いて行った。

変異株の Tn903dIIIacZ 挿入周囲の染色体の分離と塩基配列決定

L. dumoffii の変異株から抽出した染色体 DNA は HindIII あるいは BamHI で切断し、同じ制限酵素で切断したプラスミド pBR322 に連結させた。連結反応物を DH5 α へ形質転換し、形質転換混合物をカナマイシンとアンピシリンを含む LB agar 平板培地上へ塗り広げた。出現したコロニーのプラスミド DNA を抽出し、Tn903dIIIacZ 挿入周囲部の塩基配列を Tn903dIIIacZ 内の 5'末端及び 3'末端に相当する lacZ 内のプライマー (5'-CCCAGTCACGACGTTG-3') 及びカナマイシン耐性遺伝子内のプライマー (5'-AATTTAATCGCGGCCTCGAG-3')を用いて決定した。

細胞内増殖分析

L. dumoffii の J774 細胞内及び A549 細胞内での増殖は、標準的な細胞内増殖分析法で行った。*L. dumoffii* 菌株は BYE 内で早期静止期まで振盪培養した。およそ 2×10^9 の菌を遠心により沈殿させ、RPMI 1640 培養液に混濁し、1000分の1に希釈した。この菌液を、1 ウェルにつき 2×10^5 ずつ、24-well 細胞培養プレート内の J774 細胞、及び A549 細胞へ感染比率 10 となるように添加した。感染させた細胞を 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 1.5 時間静置培養後、細胞外の菌を除くために、リン酸緩衝食塩水で全てのウェルの細胞表面を 3 回洗浄した。菌の細胞内への進入菌数を測定するため、1 ml の蒸留水を 1 レーンの各ウェルに添加し、細胞内の菌を外へ解放し、CFU を計測した。残りのウェルへ 0.5 ml の新しい細胞培養液を添加した。24 時間の間隔で、各ウェルの細胞内と細胞外の菌数を合計し CFU を計測した。

相補のためのプラスミドの作成

L. dumoffii の染色体のライブラリーを作るために、染色体 DNA を *L. dumoffii* より抽出し、Sau3AI 制限酵素を用いて部分的に切断し、約 40 kb のサイズの DNA 断片を精製した。DNA 断片は、BamHI で切断し、CIP 処理したコスミドベクター、pHC79 にライゲーションさせた。ライゲーション産物は、GigapackII Gold packaging system (Stratagene) を用いて in vitro パッケージングを行った。パッケージ処理したハイブリッドコスミドを大腸菌の VCS257 株に感染させた。組み換え体のクローンは 1085 bp の 254-4 (5'-GCTTCTTCCTTTCCACCATAA-3') 及び 254-5 (5'-AGGTAGGCCTTGGGCAATTA-3') の二つのプライマーによる PCR 産物の存在をコロニーハイブリダイゼーション法でスクリーニングした。コロニーハイブリダイゼーションに使われたプローブは DIG random-primed DNA labeling system (Roche) を用いて標識した。スクリーニングのためにライブラリーから約 1000 個の組み換え体のクローンを AMP-LB 平板培地へ発育させた。数個の陽性コスミドクローンを同定した。これらのコスミドクローンの中から 254-4 と 254-5 で増幅した PCR 産物を中に含む 4 kb の *ScaI-EcoRI* 核酸断片を *HincII* 及び *EcoRI* で切断したプラスミド pUC19 にクローン化し、プラスミド pHRO17 を作成した。pHRO17 内に 254-4,5 で増幅した PCR 産物が確かに存在することはサザンハイブリダイゼーション法で確認した。pHRO17 内の 4 kb の *PstI-EcoRI* 核酸断片を *PstI* 及び *EcoRI* で切断したプラスミド pMMB207c にクローニングし、pHRO18 を作成した。プラスミド pHRO18 を *L. dumoffii* の HOLD254 株へ遺伝子導入し、HOLD254-1 株を作成した。

DNA シークエンス及びその解析

核酸シークエンス反応はプラスミドを型にして、ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kits (Applied Biosystems) と ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems) を使用して行った。決定した核酸の塩基配列と推定されるアミノ酸配列は BLASTX 及び BLASTP プログラムを用いて GenBank データベースと比較し、また同様に、未だ不完全な *L. pneumophila* Philadelphia 1 の染色体データベース (<http://genome3.cpmc.columbia.edu/~legion/ngnp1033033>) とも比較した。モチーフ探索は、Prosite プログラムを用いて行った。

ファゴソーム・リソソーム融合分析

L. dumoffii の菌株を 37°C 一晚 BYE 培地内で振盪培養し、24-well 細胞培養プレート内のガラスカバースリップ上の 8×10^4 個の J774 細胞に感染比率 25~50 の割合で感染させた。プレートを 150g で 5 分間室温で遠心し、さらに、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 20 分間培養した。リン酸緩衝食塩水で 3 回細胞表面を洗い、細胞外の菌を取り除いた後、新しい細胞培養液を各ウェルに添加した。24-well プレートをインキュベーター内に戻し、2 時間あるいは 4 時間培養を続けた。細胞を 15 分間室温の P-PFA (pH7.4 のリン酸緩衝食塩水内の 4%パラホルムアミデヒド) に浸し、固定した。カバースリップをリン酸緩衝食塩水に溶解した 0.1% サポニンに 5 分間浸し、細胞の透過性を上昇させた後、リン酸緩衝食塩水に溶解した 5% FBS (PBS-FBS) 内で 5 分間反応を止めた。リソソーム及び後期エンドソームを LAMP-1 に特異的なラットのモノクローナル抗体 1D4B (1:100)、又は、LAMP-2 に特異的な Abl93 (1:100) で染色し、菌をウサギの抗 *L. dumoffii* ポリクローナル抗体 (1:10000) で 1 時間染色した。細胞をブロッキング液で 3 回洗浄した後、Cy3 でラベルしたヒツジ抗ラット二次抗体 (1:300) と Alexa488 でラベルしたヒツジ抗ウサギ二次抗体と共に、30 分間静置した。再び、カバースリップをブロッキング液で 3 回洗浄した。使用した全ての抗体は 0.5% FBS 及び 0.1% サポニン含有リン酸緩衝食塩水で希釈した。カバースリップをスライドガラス上の 1 µl の 50% グリセロールの上へ、ひっくり返して置き、固定した。蛍光は蛍光顕微鏡 (Leica DMRB; Wetzlar) で 63 倍の油浸レンズを用いて観察した。いくつかの実験は、共焦点蛍光レーザー顕微鏡 (Radiance 2100 MP; Bio-Rad) を用いて分析した。Alexa-488 及び Cy3 二次抗体は Molecular Probes より購入した。LGP107 (マウス LAMP-1) 及び LGP96 (マウス LAMP-2) に対するラットのモノクローナル抗体はマウスの肝臓のリソソーム膜を抗原として作製した。

透過型電子顕微鏡

J774 細胞を直径 90mm の丸型シャーレに 2×10^5 cells/ml 用意し、*L. dumoffii* の菌株を感染比率 20 で 8 時間又は 24 時間感染させた。超薄切片の準備は型通りに行った。簡潔に述べると、感染させたマクロファージ細胞を 2% グルタルアルデヒドで固定し、1% 四酸化オスミウムに浸した。エタノールで脱水後、Epon 内に埋め込んだ。超薄切片標本は、酢酸ウラニル、続いて、亜鉛クエン酸塩で染色し、電子顕微鏡(JEM2000EX; JEOL)で観察した。

ストレス条件下での生存分析

L. dumoffii の菌株を 2 日から 3 日 BCYE 平板固形培地上で培養し、4ml の BYE 培養液内に植え継ぎ、37°C で少なくとも 16 時間好氣的に振盪培養を行った。一晚培養した *L. dumoffii* 株を 600nm の吸光度で約 0.1 となるよう調整し、5 時間から 7 時間さらに振盪培養した。分析時点での対数増殖期の 600nm での吸光度は、0.4 から 0.7 の間とした。菌を分割し、遠心後、同量の 1 x M63 塩(22.0 mM KH_2PO_4 , 40.2 mM K_2HPO_4 , 14.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 500nM FeSO_4 ; pH6.5)で溶解した。一つは、未処理の CFU を測定するために使用した。熱ショックストレス下に置くために、菌液を 48°C 60 分間の熱ショックを与えた。活性酸素ストレス下に置くために、菌液を 10mM 過酸化水素に 30 分間さらした。また、浸透圧ストレス下に置くために、菌液を 5M 塩化ナトリウムに 30 分間さらした。酸ストレスへ置くために菌液を 0.1M クエン酸 pH3 溶液へ 5 分間さらした。熱ストレス以外の条件で、各菌は 37°C に設定した恒温槽に静置した。設定した時間に、菌を 1 x M63 塩で 1 回洗い、CFU を計測した。

<結果>

細胞内増殖能低下変異株の分離

野生株の *L. dumoffii* Tex-KL を Tn903dIIIacZ で変異誘発を行った。Tn903dIIIacZ を中に含むプラスミド pLAW330 を *L. dumoffii* に変異導入し、790 株のカナマイシン耐性、クロラムフェニコール感受性の様々な β ガラクトシダーゼ活性を持つ *L. dumoffii* の変異株を分離した(HOLD1~656 株、HMLD4004~4044, 4048~4140 株)。790 株の変異株を個々にマウスマクロファージ細胞系の J774 細胞、及び、ヒト肺胞上皮細胞系の A549 細胞に対する細胞傷害作用でふるい分けた。変異株は、BYE 培養液を入れた 96-well 細胞培養プレート内で 2 日間静置培養した。そのうち、5ul を別の 96-well 細胞培養プレート内で培養した J774 細胞と A549 細胞に各々感染させた。感染後 24 時間ごとに、J774 細胞と A549 細胞がどれくらい傷害されているかを視覚的に観察した。最初のスクリーニングで、両細胞を傷害する能力の低下した 10 株の変異株を分離した。数回同様のスクリーニングを施行した結果、我々は、その再現性より 6 株の変異株を分離した。この 6 株の変異株の染色体 DNA を HindIII で切断し、pLAW330 をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを施行したところ、6 株のうち 5 株は、Tn903dIIIacZ の単一の挿入変異株であった。また、5 株のトランスポゾン挿入部位は *L. dumoffii* の染色体内の異なる部位に分布していた。理由はわからないが、6 株のうち 1 株の変異株は全くハイブリダイゼーションが見られなかった。そこで、ハイブリダイズの見られたこの 5 株について、さらに解析をすすめた。各変異株は、異なる DNA ハイブリダイゼーショングループに分類された。

変異株の J774 マクロファージ細胞及び肺胞上皮細胞内での増殖形態

我々は、5 株の候補について J774 マクロファージ及び A549 上皮細胞内での生存と増殖能について調べた。細胞内菌数は 3 日間に渡って計測した。野生株の *L. dumoffii* は 3 日間の培養後 J774 マクロファージ内で 100 倍に増殖した。4 株の変異株はマクロファージ細胞内で、様々な生存と複製の程度を示した。J774 マクロファージ内の 3 日間の培養で、HOLD254 株は 10 倍の増加を認めたが、HOLD491 と HOLD4001 株は、全く増加は見られず、また、HOLD4002 株は 10 倍減少した。A549 上皮細胞内では、野生株の *L. dumoffii* は 3 日間の培養後 1000 倍増加し、HOLD254 株は 10 倍増加した。一方、HOLD491 株と HOLD4001 株は 3 日間の培養後 10 倍減少し、HOLD4002 株は細胞内増殖能が高度に障害されていた(Fig. 1B)。5 株の中の 1 株 HOLD301 は野生株と同様の細胞内増殖能を示した。無細胞系では、これらの 4 株の変異株の BYE 培養液内及び BCYE 平板培地内での増殖速度は野生株と同程度であった。

トランスポゾン Tn903dIIIacZ 挿入部周囲の塩基配列解析

4 株(HOLD254, HOLD491, HOLD4001, HOLD4002)の *L. dumoffii* 変異株の Tn903dIIIacZ 挿入部とその周囲を含む HindIII 断片をクローン化した。Tn903dIIIacZ 内のプライマーを用いて、我々は部分的に塩基配列を決定し、細胞内増殖に関与する遺伝子を同定するために解析した。これらの遺伝子と合致するタンパク質について、Genbank に対する配列相同性探索を行った。HOLD254 株、HOLD491 株及び HOLD4001 株は *L. pneumophila* で既知の遺伝子に相同性のある塩基配列部にトランスポゾン挿入部を認めた。HOLD254 株で変異挿入された遺伝子は熱ショックタンパク 40 群の一つ、*djlA*(*dnaJ*-like A)遺伝子であった。*DjlA* 遺伝子は、*L. pneumophila* では、未だ機能解析はなされていなかった。HOLD491 株と HMLD4002 株はそれぞれ、*L. pneumophila* で細胞内増殖に不可欠な遺伝子と同定された *icmB*(dotO と同じ)

及び dotC と相同性のある部位にトランスポゾン挿入部を認めた。HMLD4001 株のトランスポゾン挿入部の塩基配列から推定されるタンパクは、*Bartonella henselae* の 17kDa 抗原タンパク、すなわち virB₅ タンパクに相同性を認めた。VirB₅ は VirB 遺伝子座の中にあり、下流の virD₄ 遺伝子とともに、タイプ 4 タンパク分泌機構を構築していると推定されている。近年、Ralf らも、*Bartonella tribocorum* の VirB/VirD 遺伝子座内の VirB₄ 及び VirD₄ が赤血球内の菌の増殖に必要となることを報告した。

***L. dumoffii* djIA 遺伝子のクローニングと djIA 変異株の遺伝的相補性**

DjIA は熱ショックタンパク質、DnaJ/Hsp40 ファミリー群の一つであることが知られている。まず、我々はコスミドベクター-pHC79 を用いて *L. dumoffii* の染色体ライブラリーを作成した。PCR 増幅反応 DNA 断片をプローブにして、この *L. dumoffii* の染色体ライブラリーをスクリーニングし、完全長の *djIA* 遺伝子を含む ScaI-EcoRI 核酸断片を分離した。次に、塩基配列決定のため、この DNA 断片を pUC19 ヘクローニングし、pHRO17 を作成した。pHRO17 から 4kb の PstI-EcoRI 核酸断片を切り出し、シャトルベクター-pMMB207c ヘクローニングし、pHRO18 を作成した。プラスミド pMMB207c は、内部の *mobA* 遺伝子の 3325 番目の塩基対に 8 塩基対の挿入がある pMMB207 の誘導体であり、レジオネラ属菌の中で安定して保持されるプラスミドである。プラスミド pHRO18 エレクトロポレーション法で HOLD254 株へ導入し、HOLD254 の相補株 HOLD254-1 を作成した。pHRO18 の細胞内増殖に関する HOLD254 株に対する相補能を検定するために、J774 マクロファージ細胞及び A549 上皮細胞内での、HOLD254-1 株の増殖能を調べた。相補株 HOLD254-1 株において、菌の増殖能は完全に回復していた。*DjIA* 変異株が、トランス位でクローニングした *djIA* 遺伝子で相補した後、野生株と同等の細胞内増殖能を回復したことは、*L. dumoffii* の細胞内増殖における *djIA* 遺伝子の役割が不可欠であることを証明している。

シーケンス解析

Fig.1A は *djIA* 遺伝子の周囲の構成とトランスポゾン Tn903dIIIacZ の挿入部位を表している。トランスポゾンの挿入部位は推定上のタンパクの C 末端に存在する J-domain と呼ばれる、分子シャペロン DnaJ ファミリーの明確な特徴となる部位に位置していた。Fig. 1B には、*L. dumoffii* の DjIA の推定上のアミノ酸配列と、*L. pneumophila* 及び *E. coli* の DjIA タンパクのアミノ酸配列を並べている。推定上の *L. dumoffii* の *djIA* 遺伝子は 302 アミノ酸のタンパクをコードしており、推定上の分子量は 35.33kDa で等電点は 9.65 であった。タンパクの大きさは *L. pneumophila* の 296 アミノ酸や *E. coli* の 271 アミノ酸と同程度であった。*L. dumoffii* の *djIA* 遺伝子は、*L. pneumophila* の *djIA* とは 61% の一致率であり、また、*E. coli* とは 32% の一致率を示した。N 末端に存在する、推定上の膜貫通部位(TMD)には 6 個のグリシン残基が 3 から 5 残基ごとに並んで位置していた。この構造は、*E. coli* の TMD のものと似ていた。大腸菌とレジオネラ属菌の DjIA タンパクの N 末には、一つの顕著な違いが存在した。David らは、DjIA タンパクは、内膜に位置し、まれなタイプ 3 位相 (すなわち、N 末が外部、C 末が内部) という構造を持ち、N 末端の 6 から 8 残基はペリプラスムに存在しているということを証明した。レジオネラ属菌は、膜貫通部の前にさらに長い 15 残基からなる部位を保有しており、これらは、恐らくペリプラスムに位置すると推定された。レジオネラ属菌の DjIA タンパクのもう一つの際だった特徴は、大腸菌の DjIA の場合 J-domain の前にグルタミン酸、グリシン(QG) に富んだ配列があるのに対し、レジオネラ属菌は、グルタミン酸、セリン(QS)に富んだ配列が存在するという点である(Fig. 3B)。これらの QS あるいは QG に富んだ部位が細胞内でどのような役割を担っているのかについては、まだ解明されていない。

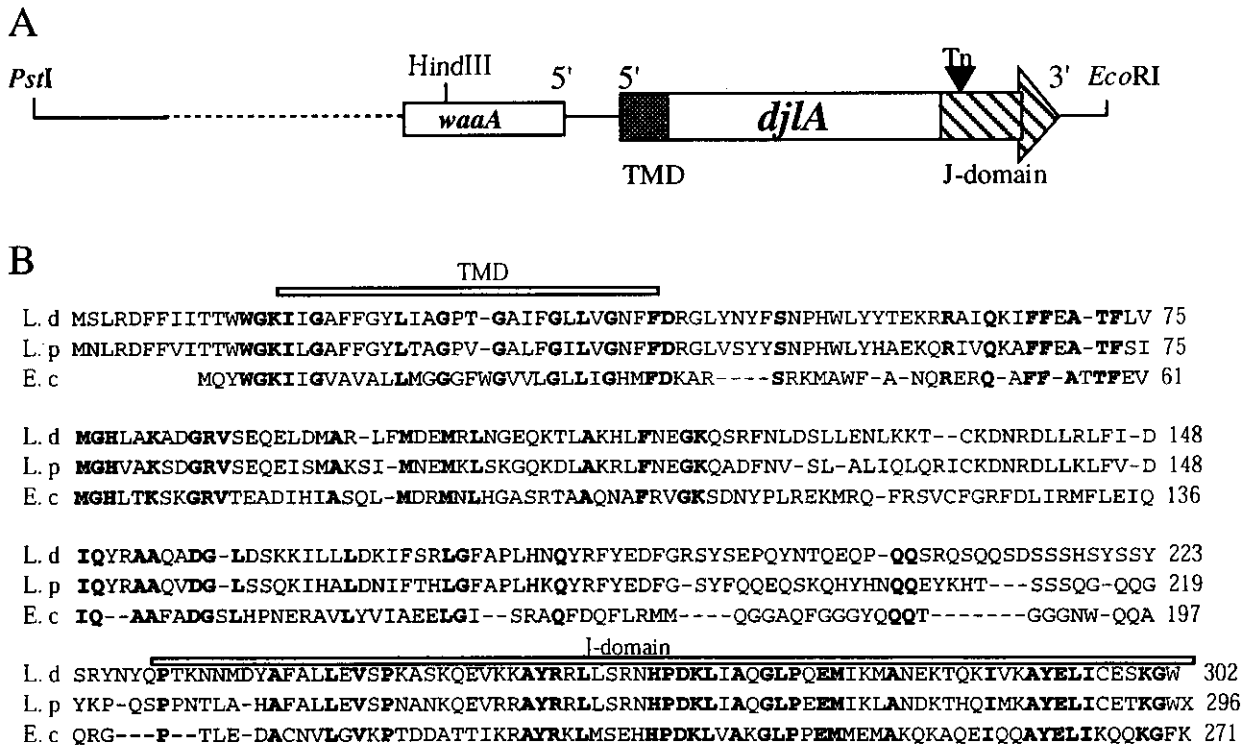


Fig.1. *djlA* 遺伝子周囲領域の染色体配列と *DjlA* タンパクのシーケンス配列。(A)*DjlA* 遺伝子周囲の pHRO18 の制限酵素切断図の一部。*DjlA* 遺伝子の部位は太字で強調されており、*djlA* 遺伝子の C 末端の J-domain と N 末端の膜貫通部(TMD)も図内に図式的に示されている。その中に染色体上に挿入されたトランスポゾン(逆さにした矢頭で示されている。Tn:トランスポゾン)。(B)*L. dumoffii* (Ld、最上段)、*L. pneumophila* (Lp、中段)及び *E. coli* (E.c、最下段)の推定される *DjlA* タンパクのシーケンス相同性。三菌種のシーケンスに保存されたアミノ酸残基は太字で示されている。ダッシュ記号で記された切れ目はシーケンス間に最大の相同性をもたせるために導入した。J-domain と膜貫通部と推定される部位は記述した。下線を引かれた塩基配列は J-domain の前に位置する QS あるいは QG 繰り返し配列を指している。

エンドサイトーシス経路の阻止

L. dumoffii の菌株がファゴソームの経路を変えることができるかどうかを見るために、我々は *L. dumoffii* を含むファゴソームとリソソームのマーカーである LAMP-1 及び LAMP-2 との局在を調べた。J774 マクロファージを *L. dumoffii* の菌株で 2 時間あるいは、4 時間感染させた。浸透性を高めた細胞を、後期エンドソーム及びリソソームタンパクの LAMP-1 あるいは LAMP-2 に特異的なモノクローナル抗体 1D4B あるいは Abl93 で染色した。*DjlA* の変異株は、LAMP-1 陽性のファゴソーム内に位置し、この菌を含むファゴソームが後期エンドソームと融合していることを示唆した。一方、野生株の *L. dumoffii* を含むファゴソームは LAMP-1 と局在が一致しなかった。ファゴソーム内の各 *L. dumoffii* の菌株を後期エンドソーム・リソソームのマーカーである LAMP-1 及び LAMP-2 との融合について数えたところ、野生株の約 80% が LAMP-1 及び LAMP-2 陰性のファゴソーム内に存在していたのに対し、HOLD254 株は 50% から 60% が LAMP-1 及び LAMP-2 陽性の場所に観察された。同様の解析を *dotC* の変異株である HOLD4002 株について行ったところ、60% から 70% が LAMP-1 及び LAMP-2 陽性のファゴソーム内に存在し、HOLD254 株と同じエンドサイトーシス経路にあることが分かった。以上より、*DjlA* 変異株はファゴソーム・リソソーム融合阻害ができないということが判明した。

DjlA 変異株の透過型電子顕微鏡下での細胞内感染像

ほ乳類のマクロファージ細胞及び原生動物内で、*L. pneumophila* は宿主の粗面小胞体(RER)に囲まれた特別の小胞内で細胞内増殖を行う。*L. dumoffii* の細胞内における局在を調べるために、*L. dumoffii* の野生株と djlA 変異株を感染させた J774 マクロファージ細胞を透過型電子顕微鏡下で観察した。感染 8 時間後には、野生株を中に含む 164 個のファゴソームのうち 61 個 (37.2%) のファゴソームの周囲に RER が観察された。一方、djlA 変異株を中に含むファゴソームは RER で囲まれたものも直接リボソームを付着させたものも全く見られなかった。8 時間後だけでなく、24 時間後の像にも djlA 変異株を含むファゴソームの周囲には RER やリボソームは観察されなかった。DjlA 変異株を中に含むファゴソームは、リソソームとの融合の結果、多くの残骸を中に保有しているようであった。一方、野生株を中に含むファゴソームは増殖する *L. dumoffii* の菌体以外何の内容物も有していなかった。感染 24 時間後には、野生株を含む多くのファゴソームは壊れて、そのファゴソームが内在するマクロファージは融解していた。

DjlA 変異株のストレス刺激への感受性

真核生物の細胞内の病原体は、有毒な酸化物や窒素化物、ファゴソーム内の酸性化、過酷な消化酵素のような粗悪な環境に遭遇する。前に述べたように、DjlA は *L. dumoffii* の細胞内増殖に不可欠である。そこで、djlA 変異株の、様々なストレスに対する感受性が增大しているかどうかを調べた。*L. dumoffii* の菌株を対数増殖期まで BYE 培養液内で振盪培養し、酸性ストレス、酸化ストレス、浸透圧ストレス、熱ストレス (pH3・5 分間、10mM 過酸化水素・30 分間、5M 塩化ナトリウム・30 分間・48°C・60 分間) に暴露した。DjlA 変異株を酸化ストレスに暴露した時、劇的な感受性の増大が観察された。また、浸透圧ストレス及び熱ストレス下でも、djlA 変異株の感受性はかなりの低下が見られた。酸性ストレスに対する感受性は野生株と djlA 変異株で差が見られなかった。これらの結果より、DjlA タンパクは *L. dumoffii* を酸化・浸透圧・熱ストレスから保護することに関与していることが推定された。対照的に、DjlA の相補株では、全てのストレス刺激に対する抵抗性が回復、あるいは増加していた。ストレス後の相補の程度の違いは、遺伝子がプラスミド上にあるか、あるいは染色体上にあるかで、遺伝子発現が異なるためであると推測された。

<考察>

レジオネラ属菌は、細胞内寄生細菌であり、宿主の防御機構に打ち勝って増殖する。これまで、*L. pneumophila* の細胞内生活サイクルに関しては多くの研究が成されてきた。しかしながら、これまで、*L. pneumophila* 以外の菌種の細胞内での状態については、ほとんど調べられていない。本研究の目的の一つは、*L. dumoffii* がいかに哺乳動物の細胞内で生存し、増殖しているかを解明し、*L. dumoffii* の細胞内増殖に関わる遺伝子を同定することである。我々は、790 株の *L. dumoffii* のトランスポゾン Tn903dIIIacZ 挿入変異株の中からマクロファージ内及び肺胞上皮細胞内で増殖できない 4 株の変異株を分離した。これらの 4 株の変異株は、感染 0 時間の段階では野生株と同程度の菌が細胞内にいることから、変異株の細胞内増殖能低下の原因は、細胞への付着能及び侵入能が低下していることではないことが分かる。4 株のうち、2 株の細胞内増殖低下変異株は、各々 *dotC* 遺伝子及び *icmB* 遺伝子に相同な塩基配列にトランスポゾンの挿入が見られた。*Dot/icm* 遺伝子群は *L. pneumophila* において細胞内増殖に必要な遺伝子群であることが示されている。今回の実験結果より、*L. dumoffii* と *L. pneumophila* の *dotC* 及び *icmB* 遺伝子は類似の機能を担っているであろうことが示唆される。*L. dumoffii* においても *dot/icm* 遺伝子群が細胞内増殖に重要な働きをすることが示されたことより、他の大半のレジオネラ属菌の病原性にも *dot/icm* 遺伝子群が関与していることが予想される。

細胞内増殖低下変異株の一つは、*dnaJ*-like A(*djlA*)遺伝子に相同性のある遺伝子にトランスポゾンの挿入があった。この遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定したところ、*L. dumoffii* の *DjlA* タンパクの一次構造は、他の菌で同定されている *DjlA* タンパクと相同であった。*DjlA* タンパクは、大腸菌において、*DnaK* の第三のコシャペロンとして同定され、分子シャペロンの *DnaJ*/*Hsp40* タンパクファミリー群、*DnaJ* 及び *CbpA* に非常に高度に保存されている *J-domain* という部位を含んでいた。*CbpA* タンパクは全体として *DnaJ* と 39% 合致しているが、*DjlA* タンパクは、*J-domain* 以外の部位で *DnaJ* 及び *CbpA* とアミノ酸配列に相同性は見られない。*DjlA* タンパクは、その構造と細胞内局在の点でも *DnaJ* ファミリータンパク群の中では異質である。*DjlA* の *J-domain* は C 末端側に存在するが、他の *dnaJ* ファミリータンパクは N 末端側に存在している。*DjlA* タンパクの N 末端は単一の膜貫通部位を通じて内膜に突出し、C 末端の *J-domain* は細胞質に局在している。一方 *DnaJ* タンパクと *CbpA* タンパクは全体が細胞質内に局在している。*DjlA* の中等度の過剰発現は、大腸菌において、コラン酸莢膜の産生を誘発する。これはまた、*DnaJ* ではなく *DnaK* 及び *GrpE* と協調して、二成分制御系の *ResC/B* を介して誘発されることが分かっている。大腸菌において、*CbpA* タンパクと異なり、*DjlA* タンパクは *DnaJ* 欠損状態で、バクテリオファージ入の複製を完全には相補できないし、また、*dnaJ*

及び CbpA 二重欠損状態で、40℃以上及び 16℃以下での菌の生育も回復させることはできない。DjlA の欠損株は大腸菌において、その増殖形態で特に際だった特徴を持たない。このように、DjlA タンパクの確かな役割は未知である。

我々は、*L. dumoffii* の DjlA 変異株の哺乳動物細胞での増殖能の欠損を示した。野生株の *L. dumoffii* を含むファゴソームは J774 マクロファージ細胞内で後期エンドソーム・リソソームマーカーである LAMP-1 及び LAMP-2 と融合せず、粗面小胞体に囲まれていた。一方、DjlA の変異株を中に含むファゴソームは LAMP-1 及び LAMP-2 と融合し、粗面小胞体によっても囲まれていなかった。*L. pneumophila* は哺乳動物細胞内で、リソソームと融合しない粗面小胞体に囲まれたファゴソーム内で増殖することが報告されており、また、*L. micdadei* は哺乳動物細胞内でリソソームと融合し、且つ粗面小胞体で囲まれていないファゴソーム内で増殖することが報告されている。Doyle らは、病原性の強い *L. longbeachae* を含むファゴソームは粗面小胞体には囲まれるが、病原性のない *L. longbeachae* の場合にはファゴソームの周囲に粗面小胞体は観察されないと報告している。我々の観察結果は、*L. dumoffii* が *L. pneumophila* で報告されているのと同様に、リソソームと融合せず、宿主の細胞内小器官を周囲に配置することができるファゴソーム内で増殖していることを示唆している。

DjlA タンパクの正確な機能は不明であるが、DjlA タンパクは、細胞内小器官のファゴソーム周囲への配置換えに直接役割を果たしているわけではなさそうである。DjlA タンパクは、Dot/icm タンパクのような、細胞内での生存と増殖に重要な役割を担うタンパク質を折り畳み、移送することに貢献しているのではないかと推測される。Dot/icm タンパクの大部分は菌体の膜に局在し、そこで大きな輸送複合体である、タイプ 4 タンパク分泌装置を形成するのに関わっている。DjlA タンパクの N 末端部位も細胞内膜に局在しており、Dot/icm タンパク群と膜内で相互作用することによって、協同して働いているのかもしれない。ネズミチフス菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) の PhoP/PhoQ 二成分制御機構はマクロファージ内での生存に不可欠な役割を果たすことが報告されている。DjlA タンパクが二成分シグナル伝達機構と調和して、*L. dumoffii* の細胞内環境への適応を促進している可能性もある。我々は、無細胞系で、DjlA 変異株が、哺乳動物の細胞内で出くわす酸化ストレスを含む数種のストレスに感受性が増大していることを示した。DjlA タンパクは細胞内増殖に重要となる遺伝子あるいはタンパクを有害なストレスから直接的にあるいは間接的に守っているのかもしれない。細胞内寄生細菌について細胞内増殖や細胞内での病原性の発現に重要な役割を果たすストレスタンパクに関するいくつかの証拠が報告されてきた。すなわち、*Brucella suis* の DnaK、*Listeria monocytogenes* の ClpC 及び ClpP、*B. abortus* の Lon や *Yersinia enterocolitica* の GsrA である。*L. pneumophila* では少なくとも 30 個のタンパクがマクロファージ内の感染課程で誘導発現されており、これらのうち、GroEL(Hsp60)、GroES そして GspA を含む、少なくとも 13 個のタンパクが無細胞系の種々のストレス条件によっても誘導発現される。近年、Lisa らは、*L. pneumophila* が、ほ乳類動物細胞内で増殖する際に、ストレスタンパク HtrA が役割を果たすことを直接的に証明した。しかし、HtrA は原生動物内では *L. pneumophila* の細胞内増殖に関与していなかった。Dot/icm タンパク群に加え、ストレスタンパクあるいは分子シャペロンがレジオネラ属菌の細胞内増殖に重要な役割を果たしていることが推測される。

最後に、我々は、*L. dumoffii* の Dot/icm 相同体及び、DjlA タンパクが、マクロファージ及び上皮細胞内感染において重要な役割を果たすことを示した。DnaK との関連も含めて、DjlA タンパクの細胞内増殖に関わる正確な仕組みは、未解決のままである。DjlA タンパクが関係する特異的基質を、さらに深く研究することによって、レジオネラ属菌の細胞内生存機構がより深く理解されるであろう。

<謝辞>

本論文の作成に当たり、助言をいただいた、中山宏明先生、史君綽博士に感謝致します。

20020118

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

P.37－P.45

Legionella pneumophila の Acanthamoeba 内増殖を調べる定性検査法(アメーバ寒天法)の開発

宮本比呂志, 谷口初美, 吉田真一

感染症学雑誌.77 巻 5 号, Page343-345(2003.05)

レジオネラ症に関する基礎的研究 土壌由来レジオネラ属菌のアメーバ内増殖性と薬剤感受性の検討

古畑勝則, 宮本比呂志, 原元宣, 福山正文

感染症学雑誌.77 巻 2 号, Page83-88(2003.02)

P.60－P.78

Detection and identification of Legionella pneumophila by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the RNA polymerase gene (rpoB).

Ko KS, Hong SK, Lee KH, Lee HK, Park MY, Miyamoto H, Kook YH.

J Microbiol Methods. 2003 Sep;54(3):325-37.

Application of RNA polymerase beta-subunit gene (rpoB) sequences for the molecular differentiation of Legionella species.

Ko KS, Lee HK, Park MY, Lee KH, Yun YJ, Woo SY, Miyamoto H, Kook YH.

J Clin Microbiol. 2002 Jul;40(7):2653-8.

P.133-P.137

レジオネラ感染 細菌学・ウイルス学

吉田真一

医学のあゆみ.206 巻 2 号, Page171

**レジオネラ属 細菌の遺伝子学 グラム陰性桿菌 (新世紀の感染症学
ゲノム・グローバル時代の感染症アップデート II 感染症の遺伝子学)**

吉田真一, 宮本比呂志

日本臨床.61 巻増刊 3 新世紀の感染症学, Page742-745