

染色体 DNA の接合伝達による *Legionella pneumophila* の病原変換に関する研究

分担研究者 宮本 比呂志 産業医科大学・医学部・微生物学

研究要旨

Legionella pneumophila において病原変換が起こるかどうか調べた。Tn903*lacZ*dII により *L. pneumophila* Philadelphia-1（血清群 1、強毒株）の染色体上にカナマイシン（Km）耐性遺伝子と *lacZ* 遺伝子を導入した株を作製した。この株と *L. pneumophila* Chicago-2（血清群 6、ストレプトマイシン[Sm]耐性、細胞内増殖能欠損株、弱毒株）を使用して接合伝達実験を行なった。Km 耐性、*lacZ*(+), Sm 耐性になったコロニーを組換え体と考え、コロニー数を数え、ドナーあたりの伝達頻度を計算した。その結果、ドナーあたり約 10^{-6} の頻度で組換え体が出現した。遺伝子型別、表現型別により、ドナーは強毒株である Philadelphia-1 株で、レシピエントは弱毒株である Chicago-2 株であった。組換え体の 2.8% は細胞内増殖能を回復しており、モルモットに Philadelphia-1 株と同様の激しい肺炎を惹起した。これらの結果は *L. pneumophila* は染色体 DNA の接合伝達システムを保有しており、これにより弱毒株が強毒株に変換することを示している。さらに、染色体上の病原遺伝子 (*icm/dot* 遺伝子) が接合伝達により水平伝播されること、染色体 DNA の接合伝達には未知の IV 型分泌機構が関与していることも示した。弱毒株が強毒株に病原変換する性質を *L. pneumophila* が持っているという事実は環境水から分離された株が弱毒株であるという理由でその生活環境水の管理を怠ることは危険であることを示しているのかもしれない。

研究背景と目的

生活環境水よりのレジオネラ症予防のためには環境水から分離されるレジオネラ属菌が病原性を持っているか否かを迅速に知ることが肝要である。そこで、分担研究者は環境分離株の病原性を迅速且つ正確に判定する検査法（アメーバ寒天法）を新たに開発し、報告した（感染症誌 2003；77：343-345）。このアメーバ寒天法は多数の環境分離株の病原性を迅速且つ正確に判定することができるため、感染源同定に有効であるだけでなく、どこのどの生活環境水が危険かを評価し、レジオネラ症予防対策をとるべき生活環境水を同定するために役立つことが期待されている。一方、細菌の病原性は病原性プラスミドの水平伝播やファージによる形質導入により変化する。もし、レジオネラにおいても病原変換がおこなるのであれば、レジオネラ症予防対策をとるべき生活環境水を同定するために上記のアメーバ寒天法を使用することは危険かもしれない。そこで、レジオネラが遺伝子の水

平伝播により病原変換するかどうかを明らかにするため本研究を開始した。現在までの研究により *L. pneumophila* の細胞内増殖を担う遺伝子領域 (*Icm/Dot* locus) が明らかにされ、24 の遺伝子が同定されている。この24種の *Icm/Dot* タンパクのうち14種は IncI プラスミド collb-P9 の Tra/Trb タンパクと、1種は IncP プラスミド RK2 の TrbI タンパクと相同性を持つことが明らかになっている。これらの接合に関与する遺伝子群が染色体上にコードされていることより、*L. pneumophila* には染色体 DNA の接合伝達系が存在することが推測された。そこで接合伝達実験を行うこととした。

研究方法

(接合伝達実験)

Tn903*lacZ*II により *L. pneumophila* Philadelphia-1 (血清群 1) の染色体上にカナマイシン (Km) 耐性遺伝子と *lacZ* 遺伝子を導入し、*L. pneumophila* Chicago-2 (血清群 6, ストレプトマイシン [Sm]耐性) と接合伝達実験を行なった。Km 耐性,*lacZ*(+),Sm 耐性になったコロニーを組換え体と考え、コロニー数を数え、ドナーあたりの伝達頻度を計算した。

(ドナー株とレシピエント株の区別)

親株とそれらの組換え体 (Transconjugants) の遺伝子型 (パルスフィールド電気泳動、AP-PCR) と表現型 (血清群) による解析を行い、ドナーとレシピエントを区別し、決定した。

(細胞内増殖試験と動物感染実験)

親株とそれらの組換え体 (Transconjugants) の細胞内増殖は *Acanthamoeba castellanii* とモルモット腹腔マクロファージを使用し、細胞内菌数を経時的に測定して行った。動物感染実験にはヒトのレジオネラ症の最もよいモデルと考えられているモルモットを使用した。超音波ネブライザーを使用して親株および組換え体 (Transconjugants) のエアロゾルをそれぞれ作製し、モルモットに吸入曝露させた。曝露感染後、経時的に体重、体温を測定するとともに、肺組織像の光顕による観察も行った。

(染色体上の病原遺伝子 (*icm/dot* 遺伝子) の水平伝播)

L. pneumophila JR32 (血清群 1, 強毒株) の *Icm/Dot* 領域内の 18 の遺伝子 (*icmS*, -R, -Q, -P, -O, -M, -K, -E, -G, -D, -J, -B -F, -V, -X, *dotA*, -B) にそれぞれカナマイシン (Km) 耐性遺伝子が挿入された 18 株をドナーとして使用した。レシピエントとして Chicago-2 株 (血清群 6, リファンピシン (Rif) 耐性) を用い、接合実験を行なった。Km 耐性 Rif 耐性になったコロニーを組換え体と考え、コロニー数を数え、ドナーあたりの伝達頻度を計算した。

(倫理面への配慮)

本研究は産業医科大学動物実験及び飼育倫理委員会の承認を受けて行われた (承認番号 AE99-014)

研究結果

(接合伝達実験)

組換え体は固形培地上で mating を行ったときにはドナーあたり約 10^{-6} の頻度で出現した。しかし、液体培地中での mating では出現しなかった。また、固形培地上での mating の際に DNaseI を加えても組換え体の出現には影響しなかった。いずれの菌の培養上清も他菌に対してプラークを作らないことも確認された。これらの結果は組換え体が接合によって出現していることを示すと考えられた。

(ドナー株とレシピエント株の区別)

親株とそれらの組換え体 (Transconjugants) の遺伝子型 (パルスフィールド電気泳動、AP-PCR) と表現型 (血清群) を調べたところ、組換え体は遺伝子型でも表現型でも *L. pneumophila* Chicago-2 (血清群 6) に類似していた。この結果よりドナーが *L. pneumophila* Philadelphia-1 (血清群 1)、レシピエントが *L. pneumophila* Chicago-2 (血清群 6) と判断した。

(細胞内増殖試験と動物感染実験)

L. pneumophila Philadelphia-1 (血清群 1) は細胞内増殖能を保持した強毒株であり、*L. pneumophila* Chicago-2 (血清群 6) は細胞内増殖能を欠く弱毒株である。染色体 DNA が強毒株から弱毒株に伝達されるという知見は組換え体の中には細胞内増殖能を回復した株が存在するのではないかという可能性を示唆した。親株と組換え体の細胞内増殖を調べたところ、1152株の組換え体のうち、32株 (2.8%) がアメーバとマクロファージ内での増殖能を回復していた。細胞内増殖能を回復した組換え体 1株と親株を使用して吸入曝露実験を行ったところ、この組換え体は *L. pneumophila* Philadelphia-1 (強毒株の親株) と同様の激しい肺炎をモルモットに引き起こした。このことは *L. pneumophila* には染色体 DNA の接合伝達系が存在し、接合伝達により弱毒株が強毒株に病原変換 (virulence conversion) することを示している。

(染色体上の病原遺伝子 (*icm/dot* 遺伝子) の水平伝播)

接合伝達による病原変換をより明確にするため、染色体上の病原遺伝子である *icm/dot* 遺伝子が伝達されるか調べた。その結果、*dotA*, -*B*, *icmV*, -*X*, -*P* 遺伝子はドナーあたり約 10^{-4} ~ 10^{-5} の頻度で、*icmQ*, -*E*, -*F* は約 10^{-6} ~ 10^{-7} の頻度で伝達された。それぞれの遺伝子により接合伝達頻度は違っていたが、調べた 18 の遺伝子は全て接合伝達された。このことは病原遺伝子が接合伝達されることを直接的に示している。

(染色体 DNA の接合伝達と Type IV secretion system)

L. pneumophila は Icm/ Dot transporter と Lvh transporter の 2 種類の Type IV secretion system を保有している。染色体 DNA の接合伝達が、これらの transporter を利用して行われているか調べた。Icm/Dot transporter 欠損株、Lvh transporter 欠損株、両方の transporter 欠損株のいずれもそれぞれの親株 (transporter 保有株) と同様の頻度で染色体 DNA を接合伝達できた。こ

のことは接合伝達に既知の Type IV secretion system が直接的には関与していないことを示している。未知の Type IV secretion system が *L. pneumophila* には存在する可能性がある。レジオネラのゲノム情報は Web 上で公開されており、Contig619 の右端には大腸菌の性線毛アッセムブリに關与する TraD,-G,-H,-F,-N,-U,-W,-C,-B に相同性の高い遺伝子群が存在している。これらの遺伝子が染色体 DNA の接合伝達に關与しているのかもしれない。

考察

L. pneumophila は染色体 DNA の接合伝達システムを持っており、これにより病原変換が起こることが明らかになった。また、*L. pneumophila* の病原遺伝子である *icm/dot* 遺伝子が接合伝達されるという知見は *L. pneumophila* のタイプ IV タンパク分泌システムである Icm/Dot システムが可動性 (mobile) の分泌システムであることも示している。今回の研究は人工培地上での現象であるが、他の菌においてバイオフィーム内で接合がおこることが報告されている。バイオフィームを形成したレジオネラで染色体 DNA の接合伝達により病原変換が起こるかどうかは今後の研究課題である。アメーバ寒天法を使用することがレジオネラ症予防対策をとるべき生活環境水を同定するための方法として妥当か否かの判断を下すには上述の研究が必要であろう。

健康危険情報

該当無し

研究発表

1. 論文発表

Virulence conversion of *Legionella pneumophila* by conjugal transfer of chromosomal DNA, 2003. J. Bacteriol. 185(22): 6712-6718.

2. 学会発表

レジオネラのマクロファージ侵入と細胞内動態に関する遺伝子と機能

第77回 日本細菌学会総会 シンポジウム4:細菌成分と宿主の分子の interaction, 平成16年4月、大阪

知的財産権の出願・登録状況

該当無し

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

Legionella pneumophila のストレス蛋白発現と宿主細胞内増殖性
との相関に関する研究

分担研究者 三宅正紀 静岡県立大学 薬学部 微生物学教室 講師

研究要旨

Legionella pneumophila 野性株 JR32 に *in vitro* で様々なストレスを与えた場合、DnaK など多くのストレス蛋白の発現が誘導されるが、過度のストレス条件ではその発現誘導は起こらず、逆に菌体の蛋白合成が著しく低下することがわかった。熱ショックを与えたときの蛋白プロファイル及び DnaK の発現量は、野性株と *icm/dot* 変異株に差は無く、病原遺伝子 *icm/dot* と *in vitro* ストレスによるストレス蛋白発現には相関がみられなかった。また、JR32 と *icm/dot* 変異株のいずれにおいても、細胞質以外では DnaK は検出されないことから、DnaK がタイプ IV 分泌装置に依存して菌体外や細胞膜へ送達される分子ではないことが示された。さらに、宿主細胞内における *L. pneumophila* のストレス蛋白発現に関して、ヒトマクロファージ様細胞 U937 に菌を感染させた場合、JR32 では DnaK をはじめとする多くのストレス蛋白の発現が誘導されるが、非病原株である *dotA* 変異株および自然突然変異株 25D ではその発現誘導がほとんどみられないことが明らかとなった。一方、自然宿主であるアメーバ *Acanthamoeba polyphaga* への感染系では、JR32 のストレス蛋白発現誘導は U937 に感染した場合よりも非常に弱く、非病原株では更にその発現が低下することが見いだされた。これらの事実は、病原株の感染宿主内における細胞内増殖性にストレス蛋白発現の必要を示唆するものであり、逆に自然界のレジオネラ属菌のリザーバーであるアメーバ内は、菌にとってストレスの少ない環境であり、その細胞内増殖に強いストレス蛋白発現を要しないことがわかった。さらに、感染宿主内における非病原株のストレス蛋白発現の低下がストレス蛋白特異的か否かを調べるために、ストレス応答とは関係なく *tac* プロモーター制御下で β -ガラクトシダーゼを発現するプラスミドを導入した菌体を U937 へ感染させ、細胞内で合成される β -ガラクトシダーゼの酵素活性を経時的に測定することにより、感染宿主内における菌の蛋白合成能を評価した。その結果、病原株は感染直後から盛んに菌体蛋白の合成を行うが、非病原株では、感染後早い時期から大部分の菌を含むファゴソームにリソソーム蛋白の集積が起こり、ストレス蛋白のみではなく全菌体蛋白の合成が著しく低下していることがわかった。この結果より、非病原株が細胞内増殖能を喪失する一因として、菌を含むファゴソームのリソソームとの融合による菌体蛋白合成能の阻害が関与することが推察された。

A. 研究目的

細胞内寄生病原体は、感染宿主のあらゆる免疫システムに抵抗し、打ち勝つことにより宿主内で増殖し、病原体独自の巧妙な病原メカニズムによってヒトに病気をもたらす。しかしながら、菌にとっては感染に伴う急激な変化や、宿主の多彩な防御免疫機構は大きなストレスとなり、それら乗り越えるにはストレス蛋白質の防御機構が不可欠であると推測される。代表的な細胞内寄生病原体のひとつであり、在郷軍人病、ポンティアック熱の原因病原体であるレジオネラ属菌において、その 90% 以上の原因菌種である *L. pneumophila* は、タイプ IV 分泌装置を形成する *icm/dot* (intracellular multiplication/defect in organelle trafficking) 遺伝子群を保有する。Icm/Dot は、宿主と相互作用する菌体由来のエフェクター分子を宿主細胞内へ送達あるいは細胞内で分泌し、菌を含むファゴソームのリソソームとの融合を阻害するなど、菌自身の生存環境を巧みに調節することにより、その宿主内増殖を可能にすると考えられ、病原性に深く関与すると推測されている。しかし、これらのみでは病原性全体を説明するには至らず、感染に伴うストレス応答の病原性との関連を重視した解析はこ

れまで極僅かで、特に *icm/dot* などの他の因子との病原ネットワーク機構を明らかにした報告は皆無である。そこで、大腸菌では代表的な分子シャペロンとして知られる DnaK をはじめとする *L. pneumophila* のストレス蛋白発現に関して、*icm/dot* 及び細胞内増殖性との相関について調べた。

B. 研究方法

<使用菌株・細胞及びその培養>

L. pneumophila は野生株 JR32、及び非病原株として、自然突然変異株 25D、*dotA* カナマイシン耐性遺伝子 (Km^r) 挿入変異株 LELA3118、*icmR* Km^r 挿入変異株 LELA3473 を使用した。菌の培養は、charcoal-yeast extract (CYE) 培地または AYE 液体培地で行った。ヒト由来マクロファージ様細胞 U937 は、10%FBS 含有 RPM1640 を用いて 5%CO₂ 下、37℃で培養した。マクロファージへの分化誘導は、PMA 存在下 2 日間培養して行った。アメーバ *Acanthamoeba polyphaga* は、PYG (protease peptone yeast extract) 液体培地を用いて 37℃で培養した。

<様々な *in vitro* ストレス負荷による *L. pneumophila* ストレス蛋白発現の解析>

対数増殖中期の *L. pneumophila* 各菌株培養液に、Tran³⁵S-Label を添加後、熱ストレスを負荷するために 42℃の水浴で一定時間振盪培養した。浸透圧ストレスとしては、NaCl、KCl、glycerol を、また活性酸素による酸化ストレスとしては、H₂O₂ をそれぞれ目的の終濃度になるように菌培養液に添加した。また、ストレスを負荷しない陰性対照として、菌液を 28℃の水浴で一定時間振盪培養した。それぞれ一定量の菌液を取り、TCA 沈殿により菌体蛋白を沈殿させ、SDS-PAGE にて解析した。また、免疫沈降法による DnaK の検出は、プロテイン G-アガロース及びウサギ抗大腸菌由来 DnaK ポリクローナル抗体 (京都大学ウイルス研究所 和田千恵子博士より御恵与) を使用して行った。

<ストレス条件下での菌体生存試験>

対数増殖中期の JR32 株培養液に、NaCl、KCl、H₂O₂ を目的の終濃度となるようにそれぞれ添加し、28℃の水浴で 60 分振盪培養することでストレス負荷を行った。段階希釈した菌液を CYE 平板培地に接種し、発育したコロニー数を生菌数 CFU (colony forming unit) として求めた。非ストレス負荷群の生存数を基準とし、各ストレス負荷群の生存率を算出した。

<菌体ストレス蛋白の画分化>

対数増殖中期 *L. pneumophila* 株のそれぞれの培養菌液に、Tran³⁵S-Label を添加し、42℃の水浴にて 30 分間振盪培養することで熱ストレスを負荷し、また対照として 28℃の水浴で 30 分間振盪培養した。遠心集菌後、上清をフィルター濾過し、濾液を TCA 沈殿することにより分泌蛋白画分を得た。全菌体蛋白は、菌体をリン酸緩衝液 (pH7.2) に懸濁し、TCA 沈殿により得た。また、この菌懸濁液をソニケーションすることで菌体を破碎し、遠心により不溶性部分を除去後、さらに超遠心することで得られる沈渣を膜画分蛋白とした。また、超遠心後の上清を TCA 沈殿することにより得られる沈渣を細胞質画分蛋白とした。

<細胞内増殖性試験>

細胞 (1 × 10⁵ cells) に対して、対数増殖後期の *L. pneumophila* 各菌株 (1 × 10⁶ bacteria) を、37℃で 1 時間感染させた (MOI=10)。ゲンタマイシン (Gm) 処理により細胞外の菌を死滅後、0.05% Triron-X100 または冷水により細胞を溶解し、段階希釈した細胞溶解液を CYE 培地上に接種した (T₀)。また、Gm 処理後の感染細胞に新たな細胞培養液を加え、さらに 4、24、48 時間 37℃で培養し、上記と同様にその細胞溶解液を CYE 培地上に接種した (T₄、T₂₄、T₄₈)。CYE 培地上に発育したコロニーを計数することにより、細胞内増殖菌を CFU/ml として算出した。

<宿主細胞内における *L. pneumophila* ストレス蛋白発現プロファイルの解析>

細胞に対数増殖後期の *L. pneumophila* 各菌株を一定の MOI で 1 時間感染させた。未感染の菌を除去し、宿主蛋白合成を阻害するため、cycloheximide 及び Gm 含有 RPM1640-10%FBS を加え、37℃で 12 時間培養した。感染細胞培養上清に Tran³⁵S-Label を加え、37℃で 2 時間培養した。上清を除去し、細胞を洗浄後、0.05% Triron-X100 または冷水、さらに凍結融解により完全に破壊後、TCA

により蛋白質を沈澱した。各試料の放射活性を統一して SDS-PAGE にて解析した。この時、同様な条件で調整した非放射標識の生菌 *L. pneumophila* 感染細胞の破碎液を系列希釈し、それぞれの希釈菌液を CYE 寒天培地に接種して発育したコロニー数より細胞内へ取り込まれた菌数を算出した。

<*L. pneumophila* 感染 U937 の免疫蛍光染色>

菌感染細胞は 4%パラホルムアルデヒド-PBS で固定し、クエンチング液及び 0.5%TritonX-100 含有 PBS でそれぞれ処理後、3%BSA-PBS でブロッキングした。細胞内 *L. pneumophila* DnaK を本研究室で作製したウサギ抗 *L. pneumophila* DnaK ポリクローナル抗体/Alexa546 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体、細胞の核及び細胞内外の菌を TO-PRO-3 で染色した。細胞内外の菌の染め分けは、TritonX-100 処理前にウサギ抗 *L. pneumophila* 抗体/Alexa546 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体で細胞外の菌のみを染色し、TritonX-100 処理後、TO-PRO-3 で細胞内外の菌を染色して行った。また、菌を含むファゴソームのリソソームとの融合を評価するために、マウス抗ヒト LAMP-2 抗体/Alexa488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体で感染細胞を染色した。試料はベクタシールドを用いて封入し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

<*L. pneumophila* の β -Galactosidase (β -Gal) 発現誘導試験>

tac プロモーターによる β -Gal 発現系を組み込んだプラスミド pAB1 を導入した *L. pneumophila* JR32/pAB1、25D/pAB1 及び LELA3118/pAB1 を $OD_{550}=0.3-0.5$ まで培養した。培養液に終濃度 1mM IPTG を加え、37℃、30 分間培養した。Z buffer に懸濁した菌懸濁液 (あらかじめ OD_{600} を測定) に、クロロホルム及び 0.1%SDS を加え、よく混和し、28℃で 5 分間反応させた。ONPG を加え、室温で 10 分間反応後、 Na_2CO_3 を加え、反応を停止させた。溶液の吸光度 OD_{420} 及び OD_{550} を測定し、以下の式

$$\text{Units of } \beta\text{-Gal} = 1,000 \times (OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}) / (OD_{600} \times t \times v)$$
 (t = 反応時間 (min), v = 菌液量 (mL))

より β -Gal の酵素活性を算出した。

また、感染細胞内において発現される菌由来 β -Gal の検出は以下の方法で行った；U937 に対して対数増殖後期の *L. pneumophila*/pAB1 各菌株を感染させた。直ちにプレートを 1,200rpm、室温にて 20 分間遠心後、遠心終了時を感染後 0 時間とし、37℃で 1 時間培養した。細胞外の菌を死滅させるため、Gm 含有 RPMI1640-10%FBS 中で培養を続けた。感染後 37℃で、それぞれ 30 分、1、2、4、12 時間培養後 IPTG を加え、さらに 30 分間培養した。また、遠心時間と遠心後の培養時間をそれぞれ 5 分間とし、IPTG を加え 30 分間培養したものを感染後 0 時間における試料とした。感染後 0 及び 30 分間では Gm 添加による細胞外の菌の除去が出来ないため、RPMI1640 で 3 回洗浄後 IPTG を添加した。それぞれの細胞を Z buffer に懸濁・溶解し、上記と同様な方法で β -Gal の酵素活性を算出した。

C. 研究結果

<熱ショックによる *L. pneumophila* ストレス蛋白発現プロファイル>

病原株 JR32 に 42℃、30 分間の熱ショックストレスを負荷した場合、熱ショックストレス非負荷時に比べ、約 2 倍から 3 倍の蛋白発現が認められた。また、74kDa に DnaK 及び 59kDa に GroEL と推測されるバンドがみられ、熱ショックストレス非負荷時の約 2 倍及び 3.5~6 倍程度の発現誘導がなされた。74kDa の蛋白バンドは、*E. coli* DnaK 抗体による免疫沈降によっても検出され、熱ショック非負荷時の約 2.5 倍の発現誘導が観察されたことから、DnaK であると断定した。一方、DnaJ は、その塩基配列情報から約 41kDa に誘導が見られることが予想されたが、抗 *E. coli* DnaJ ポリクローナル抗体と交差反応せず、免疫沈降によって検出を行うには至らなかった。

<浸透圧及び活性酸素負荷による菌体ストレス蛋白発現プロファイル>

宿主細胞内環境における菌のストレス応答を考える上で、*in vitro* での電解質及び非電解質による浸透圧ストレス及び H_2O_2 による活性酸素ストレス負荷時の菌体蛋白プロファイル調べた。終濃度

0.05mM H₂O₂ で 30 分間のストレス負荷を行なったところ、総蛋白及び DnaK は約 1.2 倍、GroEL では約 2 倍の発現が観察され、60 分間のストレス負荷では総蛋白及び DnaK が約 2 倍前後、GroEL では 3.5 倍の発現が観察された。しかし、0.5M NaCl では 30 分間または 60 分間ストレス負荷をかけた場合、総蛋白、DnaK、GroEL のいずれに関しても非ストレス処理群の 1/10 以下の発現量であり、蛋白発現の著しい低下が観察された。H₂O₂ に関しても、0.5mM 及び 1.0mM の高濃度 H₂O₂ によるストレス負荷を行った場合、30 分間及び 60 分間のストレス負荷で同様に蛋白発現量の低下が観察され、その発現量は総蛋白、DnaK、GroEL いずれにおいても非ストレス負荷群の 1/5~1/10 であった。しかし、低濃度 0.25M NaCl によっては、総蛋白及び DnaK の発現量に関してほとんど非ストレス負荷群との差が認められなかった（最大約 1.2 倍）が、GroEL に関しては、0.25M 塩化ナトリウム及び 0.25M KCl によって非ストレス負荷群の約 2 倍、0.1M NaCl 及び 0.1M KCl によって約 1.5 倍の発現誘導が観察された。ところが、それらの条件とほぼ同様の浸透圧を示す 0.2M 及び 0.5M グリセロールを添加した場合は、ほとんどストレス蛋白の発現誘導が観察されなかった。この結果はストレス蛋白の発現誘導は浸透圧上昇に起因せず、むしろ Na⁺、K⁺、Cl⁻等のイオンに起因することを示唆するものであった。

<ストレス負荷による菌の生存性>

高濃度の NaCl 及び H₂O₂ 存在下における菌体蛋白発現の著しい低下が菌の死滅に由来するものかどうかを明らかにするため、ストレス負荷後の菌の生存性を調べた。その結果、0.5M NaCl、1mM H₂O₂ あるいは 0.3MKCl 条件下でも、生存率が下がることはなかった。このような強ストレス環境への短時間の暴露は、菌の生存に影響せず、その際起こる菌体蛋白合成量の低下は、菌の死滅に由来するものではないことが分かった。

<病原株及び非病原株におけるストレス蛋白の発現プロファイル及びその局在の比較検討>

JR32 株と非病原株 LELA3118 及び LELA3473 のストレス蛋白発現を、熱ショック負荷をモデルとし比較検討した。いずれの菌株においても、全菌体蛋白および DnaK の発現は、非ストレス負荷群に比べ約 2 倍から 3 倍の発現量が認められ、病原株と非病原株の間の蛋白発現プロファイルの差は認められなかった（DnaK の発現に関しては、免疫沈降によって同様の事実を確認した）(Fig.1)。さらに、病原株及び非病原株におけるストレス蛋白の局在の変化を比較するために、熱ショック負荷後、それぞれの菌体蛋白を細胞外分泌画分、膜画分及び細胞質画分に分離し、蛋白プロファイルを比較した (Fig.2)。74kDa の DnaK のバンドは細胞質画分に現れ、株間で局在の相違はなかった。59kDa の GroEL は、熱ショックを負荷しない場合には細胞質画分に局在するが、熱ショックを与えた場合いずれの菌株においても発現量の増加と共に膜画分に、さらに JR32 株では分泌画分においてもその発現が観察され、局在の変化がみられた。また、興味深いことに、JR32 株の細胞外分泌画分において、熱ショックにより発現が誘導される約 50kDa 及び 78kDa の 2 つのバンドが観察され、このバンドは 25D 及び LELA3118 では発現が極めて弱く、ほとんどその発現がみられなかった。これらの蛋白の同定は今後の課題である。

<*L. pneumophila* 株の宿主内増殖性>

JR32 では U937、*A. polyphaga* 内で共に 24 時間以内に著しい細胞内増殖がみられ、わずかではあるが 48 時間後まで増殖傾向にあった。25D 及び LELA3118 は両細胞への感染 48 時間を通じて細胞内での増殖がほとんど見られず、また著しく減少をしている傾向もなく、菌数に大きな変化は見られなかった。また、LELA3118 は特にアメーバへの取り込みが低く、他の 2 株の 1/10 程度であった (Fig.3)。

<*L. pneumophila* 病原株及び非病原株の宿主内発現蛋白プロファイルの比較>

U937 内において、JR32 は *in vitro* での熱ショック負荷時よりも強く DnaK 及び GroEL をはじめとした HSP 発現が誘導されるが、放射活性を同じくして泳動した 25D 及び LELA3118 の場合では、全く発現が認められなかった (Fig. 4, A)。この時の細胞内取り込み菌数に関しては、JR32 と LELA3118 では同程度であり、むしろ 25D では他の 2 株よりも多かった (Fig. 4, B)。また、免疫蛍

光染色により、細胞内 *L. pneumophila* DnaK の発現を直接的に評価したところ、JR32 感染時では、細胞内での DnaK 発現が観察されが、25D 及び LELA3118 では、その発現がほとんどみられなかった。

一方、アメーバ内における JR32 のストレス蛋白発現は、U937 内に比して非常に弱く、放射活性を同じくして泳動した 25D 及び LELA3118 ではさらに弱く、その発現がほとんど認められなかった (Fig. 5, A)。この時細胞内取り込み菌数は 3 株ともほぼ同程度であった (Fig. 5, B)。また、この時のアメーバ内取り込み菌数は、U937 細胞内菌数と比較した場合においても遜色なかった (Fig. 5, B, Fig. 4, B)。

<宿主内における *L. pneumophila* の蛋白合成能の評価>

JR32、25D 及び LELA3118 にプラスミド pAB1 を導入し、それらの試験管培養において、IPTG を添加したところ いずれの株も β -Gal の強い発現誘導がみられた。さらに、これらの菌株の U937 細胞内での β -Gal 発現誘導能を調べた結果、JR32/pAB1 では感染初期からその発現誘導がみられ、経時的に単位時間あたりの発現量が増加したが、25D/pAB1 及び LELA3118/pAB1 では感染後一貫して発現量が著しく少なく、12 時間後では全く発現が認められなかった (Fig. 6)。また、25D 及び LELA3118 に関しては、感染後 4 時間後にすでに菌を含むファゴソームの 50%以上に LAMP-2 の集積がみられ (Fig. 7)。この結果より、非病原株の細胞内増殖性の喪失は、菌を含むファゴソームが感染後早い時期にリソソームとの融合を起こすことによる菌体蛋白質の合成阻害に起因する可能性が示唆された。

D. 考察

本研究において、*L. pneumophila* DnaK が、*E. coli* DnaK シャペロンシステムに関するこれまでの知見から予測されるように、熱ショックストレスにより発現が誘導されることを、放射標識アミノ酸の取り込みによるパルスラベルを行い、SDS-PAGE、オートラジオグラフィ及び抗 DnaK ポリクローナル抗体を用いた免疫沈降によって直接的に示した。一方、*L. pneumophila* DnaJ は、その塩基配列情報から約 41kDa に誘導が見られることが予想されたが、抗 *E. coli* DnaJ ポリクローナル抗体と交差反応せず、免疫沈降によって検出を行うには至らなかった(データは示していない)。*E. coli* と *L. pneumophila* の DnaK 及び DnaJ の相同性は、アミノ酸レベルにおいてそれぞれ 71.7%及び 63.0%であり、共によく保存されている。しかしながら、*L. pneumophila* dnaK 遺伝子による *E. coli* dnaK 変異株の機能回復が可能であるにもかかわらず、*L. pneumophila* dnaJ による *E. coli* dnaJ 変異株の機能の補完が出来ない事が明らかとなっており (A. B. Sadosky 等、未発表データ)、このことから DnaJ のエピトープとして認識されるアミノ酸配列は互いに特異的であり、またそれぞれの DnaJ は独自の生理機能を担っていると考えられる。また *E. coli* において、dnaK 及び dnaJ は一つのオペロンを形成しているが、DnaK の下流にコードされる DnaJ の発現量は DnaK の 1/10 程度であることが知られていることから、*L. pneumophila* でも発現量が少なく、パルスラベルによっても顕著な発現誘導が観察されなかったものと考ええる。このような理由から、本研究では DnaK を中心として機能解析を行った。

L. pneumophila がマクロファージ内で暴露されると推測されるストレス環境を想定して、酸化ストレスとして H_2O_2 、浸透圧ストレスとして NaCl、KCl 及びグリセロールを与えた場合の蛋白プロファイル調べた。グリセロールを除くストレス条件で低濃度の場合、熱ショック誘導時に比較して DnaK の発現誘導が弱く、0.1M の NaCl 及び KCl ではほとんど発現誘導が認められなかった。また、同じ熱ショックプロモーターにより発現が制御される GroEL では 2 倍程度の発現誘導が確認されたが、熱ショックによる誘導と比較して発現が弱かった。一方、DnaK の発現誘導が観察された 0.25M の NaCl 及び KCl と、ほぼ同一の浸透圧条件をグリセロールによって与えた場合、蛋白の発現誘導が観察されなかった。このことは、浸透圧上昇が *L. pneumophila* にとってストレスとはならないことを示唆した。既に報告されている *L. pneumophila* HtrA、GspA 等のストレス蛋白の解析では浸透圧ス

トレス条件として NaCl もしくは KCl が用いられてきたが、今回の結果からストレス蛋白の発現誘導は浸透圧上昇に起因せず、むしろ Na⁺、K⁺、Cl⁻等のイオンに起因することが示唆された。多くの *L. pneumophila* 病原株は、NaCl に対する感受性を示すことが知られており、その機構は菌体膜上の Icm/Dot チャンネルによる Na⁺、Cl⁻イオンの流出入の調節によるものとされているが、明確な説明はなされていない。

一方、高濃度の NaCl または H₂O₂ でストレス負荷を行った場合には、著しい蛋白合成能の低下が観察された。このことは、NaCl のみならず H₂O₂ においても確認され、ストレス暴露後の生存性試験の結果から、蛋白合成量の低下がストレス暴露による菌の死滅が原因によるものではなく、またストレス源に依存せず過度のストレスによって起こる現象であることが示された。近年、いくつかの細菌では温度変化や栄養飢餓といったストレスによる暴露で生理活性機能に変化して分裂増殖しなくなる viable but non-culturable (VNC) もしくは active but non culturable (ANC) と呼ばれる特殊な状態への移行が起こることが知られ、*L. pneumophila* においても VNC の状態になることが確認されている。今回観察された現象は、コロニー形成能に基づく生存性試験により増殖能が確認されたことから、VNC 及び ANC の「分裂増殖能の喪失」という定義からは逸脱する。しかし、ストレス条件に依存し、*L. pneumophila* が VNC 及び ANC に類似した生理活性状態への移行が起こりうる可能性も考えられなくはない。

熱ショック時における全菌蛋白プロファイル及び DnaK の発現を、野性株 JR32、*dotA* 変異株及び IcmQ に対するシャペロン活性を有する細胞質蛋白 IcmR をコードする *icmR* 変異株の間で比較検討したが、発現蛋白プロファイル及び DnaK の発現誘導に差は見られず、*in vitro* によるストレス負荷によっては、*icm/dot* 領域と DnaK を含む HSP の発現には相関が無いことを示した。また、野性株 JR32、継代培養から得た非病原株である 25D、*dotA* 変異株の菌体蛋白を、細胞外分泌画分、膜画分及び細胞質画分に分離し、それぞれのストレス蛋白発現プロファイルを比較した場合、膜画分及び細胞外分泌画分では、いずれの菌株においても DnaK 由来のバンドは確認されなかった。このことから *in vitro* において、*icm/dot* 領域と DnaK の発現及び局在の変化には、なんら相関が認められず、DnaK の Icm/Dot 依存的な菌体表層及び菌体外への送達は行われなことを明らかにした。また全ての菌株において、熱ショック誘導時に膜画分に GroEL の発現が認められた。このことは Hoffman 等による *L. pneumophila* GroEL が、熱ショックにより菌体表層への局在を増加させるという報告を支持するものであった。同時に今回の実験により、DnaK と同様にシグナル配列を待たない GroEL の菌体表層への移行が Icm/Dot に非依存的であることが示された。事実、シグナル配列非依存的な蛋白分泌装置を保持しない他の細菌 *Borrelia burgdorferi* 及び *Haemophilus influenzae* でも、それぞれ Hsp60 及び Hsp70 ホモログが菌体表層に発現し、細胞接着に関与することが示されている。また、真核細胞においても HSP70 の細胞膜への局在が報告されていることから、HSP60 及び HSP70 ファミリーの膜への移行は、全く未知のメカニズムによる可能性が考えられる。さらに、病原株である JR32 の分泌蛋白画分においてのみ、50kDa 付近及び 78kDa 付近に熱ショックにより発現が誘導されるバンドが確認された。このバンドは 25D 及び *dotA* 変異株では JR32 と比べその発現が極めて弱いことから、病原性と何らかの関連をもつ可能性も捨てきれない。今後これらの HSP の詳細な解析を行いたい。

細胞内における *L. pneumophila* の HSP 発現プロファイルを調べるにあたり、各菌株の細胞内増殖性を調べると共に感染条件を検討した。U937 細胞及び *A. polyphaga* に菌を MOI =10 で感染させたとき、JR32 では細胞内での著しい増殖性が認められた。一方、非病原株 25D 及び LELA3118 では、細胞内の菌数が感染後 48 時間を通して大きな変化が無く、細胞内の増殖能は喪失しているが、感染初期の生菌数を維持していることが分かった。しかし、いずれの菌株に関しても同じ MOI では U937 細胞と *A. polyphaga* とでは、細胞内取り込み量に差があることが示された。また、*L. pneumophila* では増殖期に依存して様々な遺伝子の発現が制御され、対数増殖後期の菌が高い病原性を示すことが報告されていることから、実際の感染には対数増殖後期の菌を用いた。しかしながら、

感染実験に用いた対数増殖後期及び *in vitro* ストレス負荷実験で用いた対数増殖中期の *L. pneumophila* JR32 に、熱ショックを与えた時、その HSP 発現プロファイルに差は無く（データは示していない）、熱ショックによる蛋白の発現誘導が菌の増殖期には依存しないことが分かった。さらに U937 細胞及び *A. polyphaga* 感染系において cycloheximide によって宿主の蛋白合成を阻害した。本実験で用いた倍量の cycloheximide を宿主に与え、12 時間培養した場合の生存数を求め、添加しなかった場合の生存数と比較したが、その生存数に差は無く、cycloheximide の影響はないものとした（データは示していない）。これらの結果に基づいて決定した菌感染条件において、細胞内における *L. pneumophila* の HSP 発現プロファイルを検討した。U937 細胞内の病原株は *in vitro* における熱ショック時よりも高い HSP の発現誘導が認められ、一方、非病原株 25D 及び LELA3118 ではほとんどその発現が認められなかったことから、非病原株は細胞内においてストレス応答が抑制される可能性が示唆された。また、*A. polyphaga* 内では、病原株及び非病原株のいずれにおいても、HSP の発現誘導がほとんど認められないことを明らかとした。*E. coli* では *rpoH* によって転写される σ^{32} 因子により、*grpE-dnaK-dnaJ* オペロンを含むレギュロンの転写活性が制御され、*L. pneumophila* においても *rpoH* ホモログが確認されている。そのため、*L. pneumophila* でも σ^{32} 因子により *dnaK-dnaJ* オペロンの転写が制御されることが推測される。今回の結果から考察すると、病原株、非病原株共に、自然宿主であるアメーバ内の環境では σ^{32} 因子のレギュロンとして制御されるストレス応答性のプロテアーゼ及びシャペロンの特異的な発現誘導をさほど必要としないと考えられる。アメーバ内では σ^S 因子をコードする *rpoS* が生存に必須であることが *rpoS* 変異株を用いた解析より明らかになっている。*rpoS* の転写は静止期の *L. pneumophila* では対数増殖期に比べ転写が活性化されることが知られ、これらの事実は σ^S 因子が *L. pneumophila* の生理状態及び環境条件に応じて制御系を変化させることを示している。一方、 σ^{32} 因子のレギュロンとして制御される DnaK の発現に関して、*Mycobacterium smegmatis* では静止期においてその増強が見られるが、*B. melitensis* では増殖期に依存しないなど、種を超えてよく保存されているにもかかわらず、その発現様式が異なる。*L. pneumophila* において、対数増殖中期及び後期における熱ショック時の DnaK 発現を比較したが、差が認められなかった。マクロファージ細胞内では、*in vitro* ストレスを負荷した場合と同じように DnaK の発現誘導が見られることから、殺菌作用が働く感染細胞内では、それらが菌の生存・増殖に何らかの不可欠な役割を果たすからこそ、その発現が惹起されると考えられ、そのシグナルを察知して発現誘導を制御する因子あるいはその機構は現時点では明らかでない。*L. pneumophila* DnaK の発現制御系及びその機能を明らかにするには、さらなる詳細な解析が今後要求されると考える。

宿主内に感染した *L. pneumophila* における DnaK の発現を直接検出するため、U937 細胞内に感染した菌をパルスラベルし、抗 *E. coli* DnaK 抗体による免疫沈降により検出を試みたが、検出できなかった（データは示していない）。これは、細胞内に取り込まれる菌数が強いシグナルとして検出できるほど多くないこと、抗体が *E. coli* DnaK に対するものであったことによると考えられた。そこで、遺伝子組み換えにより作製した *L. pneumophila* DnaK に対する特異的抗体を作製し、細胞内 *L. pneumophila* が発現する DnaK を免疫蛍光染色により検出した。その結果、細胞内において菌の DnaK 発現が、非病原株では著しく抑制されていることが直接的に明らかとなった。

U937 細胞内の *L. pneumophila* 病原株及び非病原株の間で見られる HSP 発現量の違いが、HSP 特異的に観察されるのか、蛋白全般についての現象であるのかを明らかにするため、ストレス応答に依存せず、外部から IPTG を添加することでその転写を誘導する *tac* プロモーターによる β -Gal 発現系を *L. pneumophila* に導入し、 β -Gal の酵素活性より菌の細胞内における蛋白合成能を評価した。その結果、病原株では、感染直後から盛んに蛋白合成が行われるが、非病原株では感染初期から、既に蛋白合成が著しく抑制されていることが示唆された。このことから、感染宿主内において観察された病原株と非病原株の蛋白発現の差は、HSP 特異的ではなく、細胞内における非病原株の蛋白合成全般において認められる現象であることが明らかとなった。

本研究における結果から、*L. pneumophila* の細胞内増殖機構について、以下の可能性を推察することが出来る。すなわち、*L. pneumophila* 病原株は感染宿主であるマクロファージに取り込まれた後、リソソームの菌を含むファゴソームへの融合 (phagosome-lysosome fusion, P-L fusion) を阻害し増殖するが、それと同時にファゴソーム内での菌の増殖を助ける、あるいは殺菌作用に抵抗するために HSP を発現する。一方、非病原株では P-L fusion が起こり、ファゴソーム内よりもさらに強いストレスに曝されることにより、HSP を含む蛋白合成能が著しく低下することから、細胞内増殖能を喪失するというものである。このとき、菌がいわゆる VNC もしくは ANC に近い状態に移行すると考えると、非病原株では U937 細胞内において増殖しないが、少なくとも感染 48 時間後までは、ほとんど死滅することなく生存可能であるという細胞内増殖試験の結果と矛盾しない。一方、同じ細胞内寄生菌である *L. monocytogenes* では、その細胞内増殖に DnaK が必須である事が変異株を用いた解析から明らかとなっているが、*L. monocytogenes* DnaK は熱ショック時に顕著な発現誘導が見られるにもかかわらず、細胞内においてはそれほど誘導が見られないことが知られている。これは *L. monocytogenes* が、食食後比較的早い時期に、listeriolysin O (LLO) によるファゴソーム膜の融解を起こすことで、宿主細胞の細胞質内に脱出して増殖するためであると考えられる。

以上より、*L. pneumophila* のような P-L fusion の阻害により宿主殺菌機構を回避しファゴソーム内で増殖する菌にとって、ストレス応答の誘導と、それに伴う HSP 発現がファゴソーム内環境での生存と増殖に関与しており、病原性を発揮する上で重要な一因子であると推測される。

E. 結論

- 1) *L. pneumophila* の DnaK をはじめとするストレス蛋白誘導とその局在は、*in vitro* ストレス条件下では、病原株及び非病原株で差がなかった。
- 2) マクロファージ内において、病原株では DnaK をはじめとしたストレス蛋白発現がみられたが、細胞内増殖性が低下した非病原株ではそれらの発現が抑制されていた。一方、アメーバ内では、病原株においてもストレス蛋白発現は非常に弱く、非病原株ではほとんど確認できないほどの発現量であり、これらの結果は感染宿主内と自然宿主内では *L. pneumophila* を取り巻く環境が大きく異なることを示唆した。
- 3) マクロファージ内で病原株は盛んに蛋白合成を行なうのに対して、非病原株は感染直後からストレス蛋白のみならず全菌体蛋白の合成が阻害されることを明らかとした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Masaki Miyake, Takashi Fukui, Yasuyuki Imai. Immediate cessation of protein synthesis in *Legionella pneumophila* avirulent strains at an early stage of infection in macrophages and amoebae. *Cell Microbiol* (in submitting)

2. 学会発表

渡邊拓郎、今井康之、三宅正紀：

Legionella pneumophila pmi 変異株 GB112 の性状解析

第 76 回日本細菌学会総会 (熊本)、抄録 p.316、2003 年 4 月 2 日

福井貴史、今井康之、三宅正紀：

Legionella pneumophila の熱ショック蛋白質発現と細胞内増殖性との相関について

第 76 回日本細菌学会総会 (熊本)、抄録 p.317、2003 年 4 月 2 日

三宅正紀、福井貴史、辻勉、今井康之 :

Legionella pneumophila のマクロファージ感染におけるアクチン結合蛋白質 p57 との相互作用について

第 76 回日本細菌学会総会 (熊本)、抄録 p.317、2003 年 4 月 2 日

Masaki Miyake, Takashi Fukui, Yasuyuki Imai, Howard A. Shuman :

Legionella pneumophila intracellular growth and protein expression profile within macrophage and protozoa.

American Society for Microbiology 103rd General Meeting (Washington D.C.)

Abstracts p.34, May 18-22, 2003

Sergey Pampou, Masaki Miyake, Irina Morozova, James Russo, Howard Shuman, Sergey Kalachikov :

Legionella pneumophila microarrays for expression analysis and whole-genome comparisons among related species.

American Society for Microbiology 103rd General Meeting (Washington D.C.)

Abstracts p.204, May 18-22, 2003

三宅正紀、渡辺拓郎、Maëlle Molmeret、今井康之、Yousef Abu Kwaik :

Legionella pneumophila の細胞内寄生性に関与する新規遺伝子について

第 124 年会日本薬学会 (大阪)、要旨集-3 p.142、2004 年 3 月 29 日

3. 一般講演

三宅正紀 : レジオネラ属菌の病原メカニズムについて

第 25 回星薬科大学大学院研究科助手会・大学院自治会公開合同セミナー (星薬科大学) 平成 15 年 4 月 26 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

レジオネラ属菌種の網羅的感染症診断のための遺伝子検査法と抗体検査方法の研究開発

分担研究者 江崎孝行 岐阜大学大学院医学研究科

研究要旨

Legionella 属の菌種の検出と同定を網羅的に行うために、16S rDNA 配列情報では識別ができない L.pneumophila の血清型 15 型、および 40 菌種を識別するために DnaJ 遺伝子配列を決定し、合成特異配列のオリゴ DNA を使ったシリコンマイクロアレイを試作した。さらに抗体価を特異的に測定するために Legionella 属の菌種に対する外膜蛋白抗原、及び病原因子 (Dnaj, Mip, 58kda Omp, Flagellin, Acid phosphatase, DotB,) を発現ベクターにクローニングし、特異抗原の発現に成功した。今後はこの抗原の中から有力な抗原を選択し、抗原を大量発現させるためにベクターの改良を行い、レジオネラ感染症の診断に有効な特異抗体価を迅速に計測する方法を確立する計画である。

A. 研究目的

Legionella 属の菌種は表現形質の特徴が少なく、選択培地で分離した後の菌種のレベルの同定が困難で、遺伝子検査を実施しなければ種の決定ができない。現在、もっともよく使われている 16S rDNA 配列でも種を決定するには情報さ足りず、全染色体の DNA の類似度を計測する分類学的な煩雑な実験を行わなければ最終決定はできない。そこで分類学で使用されている全染色体の DNA の類似度を計測する方法に変わる多型の遺伝子を検索し、特定の部位の配列決定だけで菌種を同定する方法を確立する。この目的のために我々は DnaJ 遺伝子のデータを蓄積し、同定と検出に利用することを目指す。

一方、検出同定に DnaJ で特異的に診断は可能になると予測しているが、感染した患者や健康者の抗体価を計測する方法にも特異的な検査が開発されていない。

現在、間接蛍光抗体がよく使われる抗体の計測方法であるが、特異性と感度に乏しく、普及していない。我々は本研究でレジオネラ属および主要菌種に特異的な表面蛋白抗原を使った抗体検査法を作成することを目指す。

B. 研究方法

1) DnaJ 遺伝子を Legionella 属の全菌種に渡り決定する。Dnaj 配列には保存領域が少なく、共通に増幅させる primer が設計できないため古典的な方法でクローン化しコロニーハイブリッドでスクリーニングする。

2) 決定した配列を使って silicon 基盤に 16S rDNA と dnaj の可変領域から 40-50 塩基を使用した特異的なオリゴDNA固定した silicon microarray を試作し、検出同定に応用するための基礎データを蓄積する。

3) Legionella 属の菌種に対する抗体値を計測する方法を作成するため、外膜蛋白抗原、及び病原因子 (dnaj, mip, 58kDa omp, flagellin, acid phosphatase 遺伝子, dotB) を小麦胚芽のリボソームを使った in vitro での蛋白発現系を使用し発現ベクターにクローニングする。この目的のために各遺伝子配列の中からアミノ酸にして 300-330 ペプチドに相当する遺伝子を増幅し、抗原の大量発現系を作成する。

C. 研究結果

1) Dnaj 遺伝子を Legionella 属菌種 40 菌種にわたり決定した。その結果 16S rDNA が 95-100%の配列の類似度に分布するのに対し、Dnaj は 75-100%と多型を示し、種の識別に利用できることがわかった (特許出願予定のため詳細なデータの記載はおこなわない)。

2)同定と検出に利用するための silicon microarray の試作

DnaJ の遺伝子配列と 16S rDNA 配列を固定した Silicon Microarray を試作した。

配列の多型から予測されたように DnaJ 配列の spot のほうが 16S rDNA 配列のスポットより、類似菌種の交差反応が少なく同定や検出に適していることが確認できた (特許出願予定のため詳細なデータの記載はおこなわない)

3)特異抗原のクローニングと無細胞系小麦胚芽細胞での発現

計画していた7つの遺伝子の発現に成功した。市販の小麦胚芽のリボソームフラクションを使って無細胞系の蛋白発現系 (東洋紡のキット) を使用した。クローニングベクターに histidine tag を付加し発現蛋白を直接結合させ生成する方法を使い、生成を簡素化した。しかし予測で 1 mg の蛋白の発現を期待していたのに反して一回あたりの発現蛋白量は数十から百ナノグラムしか回収できなかった。

D) 考察

1) Dnaj 遺伝子の多型は 16S rDNA より大きく種の同定と検出に適した遺伝子であることを確認した。特に 16S rDNA 配列で識別できない重要な菌種の鑑別に有効であったことから意義が高い。この遺伝子配列を使用した silicon oligoDNA アレイでも 16S rDNA より識別能力が高い probe をデザインすることができた。

Silicon アレイ上でも 16SrDNA の probe に比べて交差反応が見られない特異 spot が観察できた。

2) 特異抗体の計測のためにクローン化した7つの遺伝子の発現量は予想より少ないので、今後は蛋白の発現量を増加させるためのベクターの改良が必要になる。また小麦胚芽だけでなく大

腸菌の発現系を利用することも可能なため Rosh 社の in vitro の発現系も視野に入れて大量抗原発現系を作成する必要がある。

E) 結論

DnaJ 配列を使用した同定と検出は菌種レベルでは DnaJ の方が優れていた。しかし DnaJ は多型があるため属レベルで検出するための共通 primer の設計ができない。従って属レベルの検出には 16S rDNA、個々の菌種の検出・同定には DnaJ 配列を使った方法が適していると結論した。

今後の課題は silicon microarray と増幅系を組み合わせ、実用的な検出・同定システムを開発する点にある。Silicon は直径 3 mm と小さなアレイを使用することから CCD カメラを使用した高感度検出系を使用することが可能でレーザーキャナーのような高額な機器を使用しなくとも、蛍光顕微鏡を持っている細菌検査室であれば CCD カメラを装着することで容易に利用できる検査体制が構築できると見込んでいる。

患者や健康者の抗体を調べる方法として現在おこなわれている間接蛍光抗体法では菌体を使用しているため普及が限られている。われわれがクローン化し蛋白を発現させた抗原を患者血清にあてて有効な抗原を選択する必要がある。さらに抗原の大量発現に向けたベクターの改良も課題として残されている。

F) 健康危険情報

該当なし

G) 研究発表

1) 論文発表

Hongsheng Liu, Ying Li, Xinxiang Huang, Yoshiaki Kawamura, and Takayuki Ezaki. Use of the *dnaJ* gene for the detection and identification of all *Legionella pneumophila* serogroups and description of the primers used to detect 16S rDNA gene sequences of major members of the genus *Legionella*. Microbiol. Immunol. 47 : 859-869.2003.

T. Ezaki and Y. Li. Genetic identification and detection of pathogenic microorganisms 日本臨床 2003; 61, (Suppl): 373-378.

Ying Li, Yoshiaki Kawamura, Nagataoshi Fujiwara, Takashi Naka, Hongsheng Liu, Xinxiang Huang, Kazuo Kobayashi, and Takayuki Ezaki *Chryseobacterium miricola* sp. nov. a novel species isolated from condensation water of space station Mir. Syst. Applied. Microbiol. 26 : 523-528, 2003

江崎孝行.2003. 感染症に対する検査法の進歩：遺伝学的検査法. 新世紀の感染症学（下巻）. 日本臨床（臨時増刊号）. 373-380.

江崎孝行 2003 Real time PCR と系統アレイを用いた微生物相の網羅的解析方法、バイオインフォマティクスがわかる、105-111. 羊土社.

江崎孝行、2003. 病原細菌の遺伝子解析.ウイルス・細菌と感染症がわかる. P28-35. 羊土社

2) 学会発表

DNA マイクロアレイを使った微生物の解析—検出・同定・発現—. 第 77 回日本細菌学会総会（ワークショップ：Methods in Microbiology—最先端研究手法の試み）. 大阪. 2004. 河村好章

DNA マイクロアレイを使った微生物の検出および発現測定. 平成 15 年度理研シンポジウム和光. 2003. 河村好章

Pathogenic bacteria library- GTC (Gifu Type Culture). Frontier Studies and International Networking of Genetic Resources in Pathogenic Microorganisms. Tokyo. 2003. Yoshiaki Kawamura, Noriko Mishima, and Takayuki Ezaki

dnaJ sequence of *Legionella* sp. is a alternative candidate of quantitaive DNA hybridization. 第76回日本細菌学会総会. 熊本. 2003. 劉宏生、河村好章、江崎孝行

Microarray for rapid diagnosis for bacterial infection. 第76回日本細菌学会総会. 熊本. 2003. 李穎、河村好章、江崎孝行

病原体および常在菌の遺伝子を網羅的に固定したマイクロアレイを使用した呼吸器感染症の診断法の作製. 第10回日本遺伝子診療学会大会. 山田博子、江崎孝行.

H.

知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

Dnajを使用した微生物の同定・検出方法に関連した特許出願を準備中

2) 実用新案登録

3) その他

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

鹿児島県東郷町の循環式浴槽を感染源とするレジオネラ症集団発生への対応

分担研究者 藪内英子（岐阜大学大学院微生物バイオインフォマティクス）

研究協力者 縣 邦雄（アクアス株式会社つくば総合研究所）

研究要旨

平成14年8月、鹿児島県東郷町の東郷温泉ゆったり館の循環式浴槽を感染源とするレジオネラ症の集団発生が起きた。東郷町は平成14年9月3日に「東郷町レジオネラ属菌原因究明対策委員会」を設置し、藪内が委員長、縣が委員として参加した。委員会ではレジオネラ症集団発生の状況把握、原因の究明、レジオネラ属菌防止対策について検討し、その結果に従い施設を完全掛け流し式に改修、その後施設を実際に運転しての安全調査を行った。その結果安全性が確認されたので同年11月30日、東郷温泉ゆったり館は営業を再開した。委員会での原因究明の経過及びレジオネラ属菌防止対策としての施設の改修内容及び管理方法について報告する。

A. 研究目的

循環式温泉浴場施設を感染源とするレジオネラ症の集団発生は、社会的な問題となっており、安全かつ安心な入浴施設に対する国民の要望は強い。実際にレジオネラ症集団発生の起きた施設の管理状況と改善策を調査研究し今後の参考とすることは、温泉浴場施設のレジオネラ症集団発生防止に寄与するものである。

B. 研究方法

平成14年8月に発生した、鹿児島県東郷町の循環式温泉浴場施設でのレジオネラ症集団発生に関して、藪内を委員長とする「東郷町レジオネラ属菌原因究明対策委員会」が発足した。委員会は平成14年9月4日から同年11月24日まで6回の委員会を開催し、施設の視察、設計・施工業者からの説明、感染源の検討、レジオネラ属菌増殖の要因、施設の改修の検討、運用管理方法の検討を行った。

今回の研究は、「東郷町レジオネラ属菌原因究明対策委員会」の活動結果をもとにまとめた。

（倫理面への配慮：該当せず）

C. 研究結果

引用資料：平成15年3月 鹿児島県東郷町発行の「東郷温泉ゆったり館」のレジオネラ菌検出に伴う施設改修及びレジオネラ肺炎患者等への補償に関する報告書。

1. はじめに

「東郷温泉ゆったり館」は、平成14年7月16日に完成し、7月30日から8月2日にかけて温泉施設を町民に無料開放した後、8月10日から営業を開始した。

8月23日の夕方、鹿児島県庁から東郷町に対して「長崎県在住でレジオネラ肺炎で8月20日死

亡した男性が東郷温泉ゆったり館を利用していた」という情報提供がなされた。東郷町は住民への周知期間を経て8月26日から自主的に温泉の営業を自粛した。

8月23日の夜、川内保健所が温泉水を採取し検査した結果、大浴場から 1.3×10^5 個/100mlのレジオネラ属菌を検出、マスコミ発表を8月30日に行った。

東郷町はレジオネラ属菌の専門家、県関係者及び住民代表者等からなる「東郷町レジオネラ属原因究明対策委員会」を9月3日に設置し、9月4日から11月24日の約3ヶ月間に合計6回の検討委員会を開催し、汚染源等の究明と再発防止について検討を行った。

施設改修後、温泉水のレジオネラ属菌等の確認をした結果、全て基準を満たしたので、11月24日の第6回検討委員会において安全宣言がなされ、11月30日から温泉の営業を再開した。

2. レジオネラ症集団発生の概要

本集団発生に関して、最終的に東郷町が確診患者及び感染の疑いのある者として把握した人数は、次表の通りである。

	対象者(人)	備考
確診患者	9	県への届け出により把握
感染の疑いのある者	267	本人からの申し出又は医療機関への照会により把握など
合計	276	

レジオネラ肺炎確診患者9名の内訳は以下の通りであった。(すべて男性)

番号	年齢	入浴日	月/日				診断方法	転帰
			発病	初診	診断確定	届出		
1	63	8/13.14	8/15	8/20	8/22	8/23	尿中抗原	死亡
2	62	8/18	8/23	8/29	9/3	9/3	尿中抗原	治癒
3	52	8/17	8/22	8/25	9/6	9/6	尿中抗原	治癒
4	70	8/17.20	8/24	9/2	9/6	9/6	尿中抗原	治癒
5	60	8/15	8/17	8/21	9/7	9/7	尿中抗原	治癒
6	66	8/19	8/21	9/7	9/11	9/11	尿中抗原	治癒
7	82	8/19	8/26	8/30	9/12	9/12	IFA、256倍	治癒
8	76	8/13	8/17	8/19	9/1	9/25	尿中抗原	治癒
9	53	8/16	8/22	8/24	9/27	9/27	IFA、512倍	治癒

3. レジオネラ肺炎集団感染の要因

本集団発生における、浴槽水系統でのレジオネラ属菌の増殖、及び浴槽水中のレジオネラ属菌により入浴者が感染した要因について検討した結果、以下の事項が考えられた。

(1) 浴槽内でレジオネラ属菌が増殖した要因

① ろ過装置の処理能力

開業後、多数の入浴者があり、一時的にろ過装置の濁質除去能力を超えていた可能性があった。

② ろ過装置のろ材材質