

component regulatory system, PhoP-PhoQ, of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays an essential role in survival within macrophages (28). It is possible that DjIA promotes *L. dumoffii* to adapt to intracellular environments and to coordinate with the two-component signal transduction systems. In vitro, DjIA-deficient mutants showed an increased susceptibility to several stresses, including oxidative stress, that might be encountered by bacteria in mammalian cells. DjIA might protect the genes or proteins, including Dot/Icm and catalase-peroxidase (7), that are important for intracellular growth, from harmful stress in a direct or indirect manner. Several lines of evidence for the important role of stress proteins in intracellular growth and virulence have been reported for intracellular pathogens; these include DnaK of *Brucella suis* (38), ClpC and ClpP of *Listeria monocytogenes* (24, 54), Lon of *B. abortus* (53), and GsrA of *Yersinia enterocolitica* (69). In *L. pneumophila*, at least 30 proteins are included during the intracellular infection of macrophages and at least 13 of these proteins, including GroEL (Hsp60), GroES, and GspA, are also induced by several stress conditions in vitro (1, 2, 21). Recently, Pedersen et al. (50) demonstrated direct evidence for the role of the stress protein of *L. pneumophila*, HtrA, during intracellular growth in mammalian cells but not in protozoan cells. Our data indicated that DjIA plays an important role during intracellular growth in both mammalian and protozoan cells. Besides Dot/Icm proteins, stress proteins or molecular chaperones might play an important role in the intracellular growth of the *Legionella* species.

In conclusion, we showed the essential role of *L. dumoffii* Dot/Icm homologues and DjIA during the intracellular infection of mammalian cells and protozoa. The precise mechanism of DjIA involvement in intracellular multiplication, including interaction with DnaK, remains to be elucidated. Further investigation of specific substrates with which DjIA interacts will lead to a better understanding of the intracellular survival mechanism in the *Legionella* species.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge H. A. Shuman for his generous gifts of plasmids pLAW330 and the pMMB207c. We thank H. Nakayama and C. C. Sze for scientific discussion. We also thank H. Fujita, K. Iida, and H. Kajiwara for technical assistance. We thank L. Saza for manuscript preparation.

This work was supported by grants-in-aid for scientific research (B)(2)14370094, (B)(1)12490009, and (C)(2)15590391 from the Ministry of Education, Science, Culture and Sports of Japan. This work was also supported by Health and Labour Sciences research grants (H15-Ganyobou-095) from the Ministry of Health, Labour and Welfare.

REFERENCES

1. Abu Kwaik, Y., B. I. Eisenstein, and N. C. Engleberg. 1993. Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages. *Infect. Immun.* 61:1320-1329.
2. Abu Kwaik, Y., L. Y. Gao, O. S. Harb, and B. J. Stone. 1997. Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Mol. Microbiol.* 24:629-642.
3. Abu Kwaik, Y., C. Venkataraman, O. S. Harb, and L. Y. Gao. 1998. Signal transduction in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* upon attachment and invasion by *Legionella micdadei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3134-3139.
4. Allij, O. A., S. Zink, N. K. Von Lackum, and Y. Abu-Kwaik. 2003. Comparative assessment of virulence traits in *Legionella* spp. *Microbiology* 149:631-641.
5. Andrews, H. L., J. P. Vogel, and R. R. Isberg. 1998. Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect. Immun.* 66:950-958.
6. Baine, W. B. 1985. Cytolytic and phospholipase C activity in *Legionella* species. *J. Gen. Microbiol.* 131:1383-1391.
7. Bandyopadhyay, P., B. Byrne, Y. Chan, M. S. Swanson, and H. M. Steinman. 2003. *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases are required for proper trafficking and growth in primary macrophages. *Infect. Immun.* 71:4526-4535.
8. Benin, A. L., R. F. Benson, and R. E. Besser. 2002. Trends in legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. *Clin. Infect. Dis.* 35:1039-1046.
9. Bozue, J. A., and W. Johnson. 1996. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.* 64:668-673.
10. Brabetz, W., C. E. Schirmer, and H. Brade. 2000. 3-Deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) transferase of *Legionella pneumophila* transfers two Kdo residues to a structurally different lipid A precursor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182:4654-4657.
11. Brenner, D. J. 1985. The new species of *Legionella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:50-59.
12. Byrne, B., and M. S. Swanson. 1998. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect. Immun.* 66:3029-3034.
13. Casaregola, S., M. Chen, N. Bouquin, V. Norris, A. Jacq, M. Goldberg, S. Margaron, M. Tempete, S. McKenna, H. Sweetman, et al. 1991. Analysis of a myosin-like protein and the role of calcium in the *E. coli* cell cycle. *Res. Microbiol.* 142:201-207.
14. Chen, L., Y. Chen, D. W. Wood, and E. W. Nester. 2002. A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 184:4838-4845.
15. Clarke, D. J., L. B. Holland, and A. Jacq. 1997. Point mutations in the transmembrane domain of DjIA, a membrane-linked DnaJ-like protein, abolish its function in promoting colanic acid production via the Res signal transduction pathway. *Mol. Microbiol.* 25:933-944.
16. Clarke, D. J., A. Jacq, and I. B. Holland. 1996. A novel DnaJ-like protein in *Escherichia coli* inserts into the cytoplasmic membrane with a type III topology. *Mol. Microbiol.* 20:1273-1286.
17. Coers, J., J. C. Kagan, M. Matthews, H. Nagai, D. M. Zuckman, and C. R. Roy. 2000. Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Mol. Microbiol.* 38:719-736.
18. Cordes, L. G., H. W. Wilkinson, G. W. Gorman, B. J. Fikes, and D. W. Fraser. 1979. Atypical *Legionella*-like organisms: fastidious water-associated bacteria pathogenic for man. *Lancet* ii:927-930.
19. Da Silva, T. R., J. R. De Freitas, Q. C. Silva, C. P. Figueira, E. Roxo, S. C. Leao, I. A. De Freitas, and P. S. Veras. 2002. Virulent *Mycobacterium fortuitum* restricts NO production by a gamma interferon-activated J774 cell line and phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.* 70:5628-5634.
20. Doyle, R. M., N. P. Cianciotto, S. Banvi, P. A. Manning, and M. W. Heuzenroeder. 2001. Comparison of virulence of *Legionella longbeachae* strains in guinea pigs and U937 macrophage-like cells. *Infect. Immun.* 69:5335-5344.
21. Fernandez, R. C., S. M. Logan, S. H. Lee, and P. S. Hoffman. 1996. Elevated levels of *Legionella pneumophila* stress protein Hsp60 early in infection of human monocytes and L929 cells correlate with virulence. *Infect. Immun.* 64:1968-1976.
22. Fields, B. S. 1996. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* 4:286-290.
23. Furuno, K., T. Ishikawa, K. Akasaki, S. Yano, Y. Tanaka, Y. Yamaguchi, H. Tsuji, M. Himeno, and K. Kato. 1989. Morphological localization of a major lysosomal membrane glycoprotein in the endocytic membrane system. *J. Biochem. (Tokyo)* 106:708-716.
24. Gaillot, O., E. Pellegrini, S. Bregenholz, S. Nair, and P. Berche. 2000. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35:1286-1294.
25. Gao, L. Y., O. S. Harb, and Y. A. Kwaik. 1998. Identification of macrophage-specific infectivity loci (*mil*) of *Legionella pneumophila* that are not required for infectivity of protozoa. *Infect. Immun.* 66:883-892.
26. Genevoux, P., F. Schwager, C. Georgopoulos, and W. L. Kelley. 2001. The *djIA* gene acts synergistically with *dnaJ* in promoting *Escherichia coli* growth. *J. Bacteriol.* 183:5747-5750.
27. Genevoux, P., A. Wawrzynow, M. Zylicz, C. Georgopoulos, and W. L. Kelley. 2001. DjIA is a third DnaK co-chaperone of *Escherichia coli*, and DjIA-mediated induction of colanic acid capsule requires DjIA-DnaK interaction. *J. Biol. Chem.* 276:7906-7912.
28. Groisman, E. A. 2001. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol.* 183:1835-1842.
29. Hales, L. M., and H. A. Shuman. 1999. The *Legionella pneumophila* *rhoS* gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*. *J. Bacteriol.* 181:4879-4889.
30. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
31. Hohn, B., and J. Collins. 1980. A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* 11:291-298.

32. Horwitz, M. A. 1983. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158:1319-1331.
33. Horwitz, M. A. 1983. The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158:2108-2126.
34. Horwitz, M. A., and F. R. Maxfield. 1984. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J. Cell Biol.* 99:1936-1943.
35. Joshi, A. D., S. Sturgill-Koszycki, and M. S. Swanson. 2001. Evidence that Dot-dependent and -independent factors isolate the *Legionella pneumophila* phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. *Cell. Microbiol.* 3:99-114.
36. Joshi, A. D., and M. S. Swanson. 1999. Comparative analysis of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* virulence traits. *Infect. Immun.* 67:4134-4142.
37. Kelley, W. L., and C. Georgopoulos. 1997. Positive control of the two-component ResC/B signal transduction network by DjIA: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 25:913-931.
38. Kohler, S., J. Teyssier, A. Cloeckert, B. Rouot, and J. P. Liautard. 1996. Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of *Brucella suis* within U937-derived phagocytes. *Mol. Microbiol.* 20:701-712.
39. Kuronita, T., E. L. Eskelinen, H. Fujita, P. Saftig, M. Himeno, and Y. Tanaka. 2002. A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J. Cell Sci.* 115:4117-4131.
40. Lewallen, K. R., R. M. McKinney, D. J. Brenner, C. W. Moss, D. H. Dail, B. M. Thomason, and R. A. Bright. 1979. A newly identified bacterium phenotypically resembling, but genetically distinct from, *Legionella pneumophila*: an isolate in a case of pneumonia. *Ann. Intern. Med.* 91:831-834.
41. Maruta, K., H. Miyamoto, T. Hamada, M. Ogawa, H. Taniguchi, and S. Yoshida. 1998. Entry and intracellular growth of *Legionella dumoffii* in alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:1967-1974.
42. Maruta, K., M. Ogawa, H. Miyamoto, K. Izu, and S. I. Yoshida. 1998. Entry and intracellular localization of *Legionella dumoffii* in Vero cells. *Microb. Pathog.* 24:65-73.
43. Matthews, M., and C. R. Roy. 2000. Identification and subcellular localization of the *Legionella pneumophila* IcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells. *Infect. Immun.* 68:3971-3982.
44. Miyamoto, H., H. Taniguchi, and S. Yoshida. 2003. A simple qualitative assay for intracellular growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba culbertsoni*. *Kansenshogaku Zasshi.* 77:343-345. (In Japanese)
45. Miyamoto, H., S. I. Yoshida, H. Taniguchi, and H. A. Shuman. 2003. Virulence conversion of *Legionella pneumophila* by conjugal transfer of chromosomal DNA. *J. Bacteriol.* 185:6712-6718.
46. Moffat, J. F., and L. S. Tompkins. 1992. A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* 60:296-301.
47. Morales, V. M., A. Backman, and M. Bagdasarian. 1991. A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene* 97:39-47.
48. Nagai, H., and C. R. Roy. 2001. The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter. *EMBO J.* 20:5962-5970.
49. Padmalayam, L., K. Karem, B. Baumstark, and R. Massung. 2000. The gene encoding the 17-kDa antigen of *Bartonella henselae* is located within a cluster of genes homologous to the *virB* virulence operon. *DNA Cell Biol.* 19:377-382.
50. Pedersen, L. L., M. Radulic, M. Doric, and Y. Abu Kwaik. 2001. HtrA homologue of *Legionella pneumophila*: an indispensable element for intracellular infection of mammalian but not protozoan cells. *Infect. Immun.* 69:2569-2579.
51. Purcell, M., and H. A. Shuman. 1998. The *Legionella pneumophila* *icmGC-DjBF* genes are required for killing of human macrophages. *Infect. Immun.* 66:2245-2255.
52. Quinn, F. D., M. G. Keen, and L. S. Tompkins. 1989. Genetic, immunological, and cytotoxic comparisons of *Legionella* proteolytic activities. *Infect. Immun.* 57:2719-2725.
53. Robertson, G. T., M. E. Kovach, C. A. Allen, T. A. Ficht, and R. M. Roop, Jr. 2000. The *Brucella abortus* Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice. *Mol. Microbiol.* 35:577-588.
54. Rouquette, C., C. de Chastellier, S. Nair, and P. Berche. 1998. The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol. Microbiol.* 27:1235-1245.
55. Roy, C. R., K. H. Berger, and R. R. Isberg. 1998. *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol. Microbiol.* 28:663-674.
56. Roy, C. R., and L. G. Tilney. 2002. The road less traveled: transport of *Legionella* to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 158:415-419.
57. Sadosky, A. B., L. A. Wiater, and H. A. Shuman. 1993. Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages. *Infect. Immun.* 61:5361-5373.
58. Sambrook, J., and W. J. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
59. Schulein, R., and C. Dehio. 2002. The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol. Microbiol.* 46:1053-1067.
60. Segal, G., M. Purcell, and H. A. Shuman. 1998. Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1669-1674.
61. Segal, G., and H. A. Shuman. 1998. How is the intracellular fate of the *Legionella pneumophila* phagosome determined? *Trends Microbiol.* 6:253-255.
62. Small, P. L., L. Ramakrishnan, and S. Falkow. 1994. Remodeling schemes of intracellular pathogens. *Science* 263:637-639.
63. Sturgill-Koszycki, S., and M. S. Swanson. 2000. *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J. Exp. Med.* 192:1261-1272.
64. Ueguchi, C., M. Kakeda, H. Yamada, and T. Mizuno. 1994. An analogue of the DnaJ molecular chaperone in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1054-1058.
65. Ueguchi, C., T. Shiozawa, M. Kakeda, H. Yamada, and T. Mizuno. 1995. A study of the double mutation of *dnaJ* and *cbp4*, whose gene products function as molecular chaperones in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:3894-3896.
66. Wai, S. N., Y. Mizunoe, A. Takade, S. I. Kawabata, and S. I. Yoshida. 1998. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3648-3655.
67. Wall, D., M. Zylicz, and C. Georgopoulos. 1994. The NH₂-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda DNA replication. *J. Biol. Chem.* 269:5446-5451.
68. Wiater, L. A., A. B. Sadosky, and H. A. Shuman. 1994. Mutagenesis of *Legionella pneumophila* using Tn903 *dllacZ*: identification of a growth-phase-regulated pigmentation gene. *Mol. Microbiol.* 11:641-653.
69. Yamamoto, T., T. Hanawa, S. Ogata, and S. Kamiya. 1996. Identification and characterization of the *Yersinia enterocolitica* *gsrA* gene, which protectively responds to intracellular stress induced by macrophage phagocytosis and to extracellular environmental stress. *Infect. Immun.* 64:2980-2987.
70. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
71. Yu, V. L., J. F. Plouffe, M. C. Pastoris, J. E. Stout, M. Schousboe, A. Widmer, J. Summersgill, T. File, C. M. Heath, D. L. Paterson, and A. Cheresky. 2002. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J. Infect. Dis.* 186:127-128.
72. Yura, T., H. Mori, H. Nagai, T. Nagata, A. Ishihama, N. Fujita, K. Isono, K. Mizobuchi, and A. Nakata. 1992. Systematic sequencing of the *Escherichia coli* genome: analysis of the 0-2.4 min region. *Nucleic Acids Res.* 20:3305-3308.
73. Zuber, M., T. A. Hoover, and D. L. Court. 1995. Analysis of a *Coxiella burnetii* gene product that activates capsule synthesis in *Escherichia coli*: requirement for the heat shock chaperone DnaK and the two-component regulator ResC. *J. Bacteriol.* 177:4238-4244.
74. Zuckman, D. M., J. B. Hung, and C. R. Roy. 1999. Pore-forming activity is not sufficient for *Legionella pneumophila* phagosome trafficking and intracellular growth. *Mol. Microbiol.* 32:990-1001.

Editor: S. H. E. Kaufmann

レジオネラの病原性 発現機構

宮本比呂志 (産業医科大学医学部微生物学教室助教授)
吉田 真一 (九州大学大学院医学研究院細菌学分野教授)

Point

- レジオネラの病原性発現機構は、細菌側因子と宿主側因子から説明できる。
- 細菌側因子としては、レジオネラのマクロファージ内増殖能が最も重要である。この増殖能を失った変異株は病原性を発揮できない。また、感染急性期にマクロファージおよび肺胞上皮細胞にアポトーシスを誘導すること、肺胞上皮細胞内で増殖することも病原性の発現・強化に寄与している。
- 宿主側因子としては、レジオネラの細胞内増殖やアポトーシスの制御に関する遺伝子 *Lgn1*、感染防御機構としてのTH1型サイトカイン応答が重要である。

レジオネラ (*Legionella*) 属菌は鞭毛を有する好気性グラム陰性桿菌で、生体防御の第一線で働くマクロファージ (M ϕ) の殺菌機構に抵抗し、感染後48時間で500~1,000倍に増殖する細胞内寄生菌である (図1、図2)。本属菌はエアロゾル感染によりヒトに急性肺炎 (在郷軍人病) やインフルエンザ様の熱性疾患 (ポンティアック熱) を惹起する病原性をもっている。2004年8月現在、50菌種が正式に命名されており、血清群は71に上っているが、臨床検体や環境中からの分離頻度の高さが

ら多くの研究が *Legionella pneumophila* を使用して行われている。そこで、本稿では *L. pneumophila* を中心にレジオネラの病原性発現機構について、細菌側因子と宿主側因子の両側から概説したい。

細菌側因子

1. マクロファージ (M ϕ) 内増殖能
モルモット M ϕ 内増殖能を失った *L. pneumophila* の変異株はモルモット

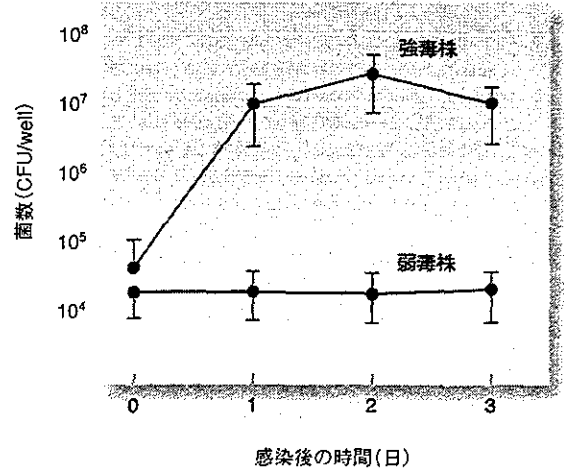


図1 Legionella pneumophilaのマクロファージ内増殖

強毒株(●)と弱毒株(●)をモルモット腹腔マクロファージに*in vitro*でそれぞれ感染させた後、経時的にマクロファージ内の菌数を測定した(平均±標準偏差)。強毒株は感染後2日で500~1,000倍に増殖するが、弱毒株は増殖が認められない。

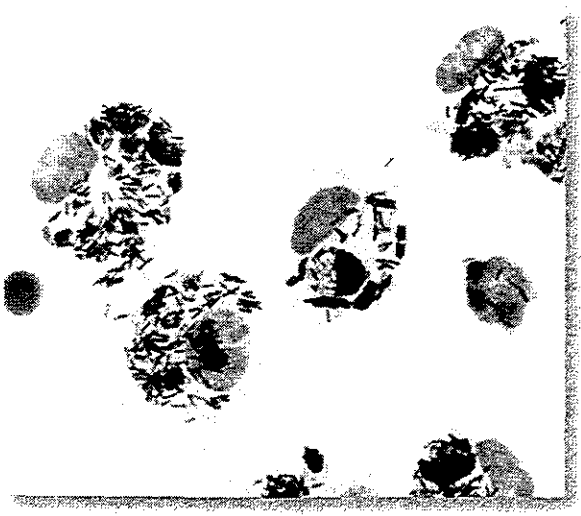


図2 モルモット腹腔マクロファージ内で増殖している Legionella pneumophila 強毒株

マクロファージに*in vitro*で強毒株を感染させて48時間後にヒメネツ染色を行い、光学顕微鏡で観察した(倍率は1,000)。マクロファージの殺菌機構(活性酸素による酸素依存性殺菌とリソソーム顆粒による酸素非依存性殺菌)に抵抗し、増殖している菌が紫色に染まっている。

*1...酸素依存性殺菌

食細胞が異物を貪食するとレスピラトリバースト(respiratory burst)と呼ばれる著明な酸素消費の亢進(休止期の15倍に達する)が起こる。この酸素の大部分は反応性に富む活性酸素に換えられ殺菌に使用される。一電子還元を受けた酸素はスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)となり、細胞膜の外側(食胞の内部)へ放出される。O₂⁻を不均衡化反応により消去する酵素がスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)である。

*2...酸素非依存性殺菌

活性酸素による細胞内殺菌は、酸素を利用できない環境では発動されない。しかし、活性酸素が生成されなくても、ファゴソームとリソソームが融合し、リソソーム顆粒(種々の抗菌因子を含んでいる)がファゴソーム内に放出されると殺菌が起こる。

に病原性を発揮できないこと(図3)が明らかにされているので、本菌が病原性を発揮するうえで最も重要な性質は、Mφの殺菌に抵抗し、その中で増殖し、結果的にその細胞を殺す能力をもっていること(Mφ内増殖能)である。そのため本菌のMφ内増殖能について形態学的、生化学的、遺伝学的に多くの研究が行われてきた。

その結果、本菌の細胞への付着・侵入・細胞内増殖・再感染のための感染細胞からの脱出などに関与する蛋白・遺伝子が明らかにされてきた(表1)。L. pneumophilaは主に補体受容体を介してMφに貪食される。補体受容体を介した貪食では、レスピラトリバースト(respiratory burst)による活性酸素の産生は少ないが、菌体表層に分泌されるCu, Zn-SOD(superoxide dismutase)とMip(macrophage infectivity potentiator)蛋白に

より酸素依存性殺菌*1に抵抗する。その後、ファゴソームの酸性化やリソソームとの融合を阻害することで、菌はリソソーム顆粒による酸素非依存性殺菌*2にも抵抗する。電子顕微鏡でレジオネラ感染Mφを経時的に観察すると、菌を貪食したファゴソームの周りに小胞が集まってきて融合し、ファゴソーム膜は小胞体膜に置き換わることで、粗面小胞体由来のリボソームが変容したファゴソームの周囲に集まってきてファゴソーム膜に付着すること、菌はリボソーム付着ファゴソーム内で増殖を開始することなどが認められる。

弱毒株の場合は、ファゴソームとリソソームの融合が起こり菌は殺され、上述した細胞内小器官の集合も観察されない。

強毒株の感染に伴うファゴソームの酸性化阻害やリソソームとの融合阻

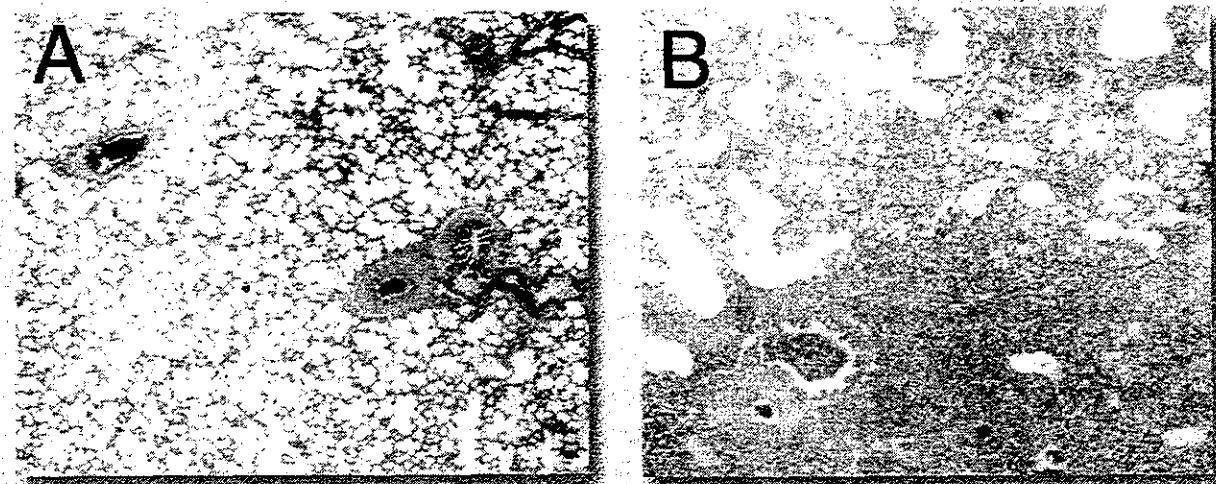


図3 *Legionella pneumophila*をエアロゾル感染させたモルモットの肺組織像

マクロファージ内増殖能を欠損した株(A)と保有している株(B)をそれぞれモルモットにエアロゾル曝露し、曝露4日後の肺組織をHE染色で観察した。マクロファージ内増殖能を欠損した株を感染させたモルモットの肺は炎症細胞の浸潤もなく正常な組織像を呈している。対照的にマクロファージ内増殖能を保有している株を感染させたモルモットでは肺胞腔内に著明な炎症細胞の浸潤を認め、激しい肺炎の所見が観察される。レジオネラが病原性を発揮するうえで最も重要な性質はマクロファージ内増殖能であることを直接的に示している。

有している株を感染させたモルモットでは肺胞腔内に著明な炎症細胞の浸潤を認め、激しい肺炎の所見が観察される。レジオネラが病原性を発揮するうえで最も重要な性質はマクロファージ内増殖能であることを直接的に示している。

機能	遺伝子	遺伝子産物	報告(参考)文献
付着	<i>pilE</i>	IV型線毛	Infect Immun 1998; 66: 1768.
	<i>ompS</i>	主要外膜蛋白 (ポーリン)	J Bacteriol 1992; 174: 914.
	<i>hsp60</i>	60-kDa熱ショック蛋白	Infect Immun 1998; 66: 4602.
侵入および貪食	<i>flaA</i>	鞭毛	Infect Immun 2001; 69: 2116.
	<i>icm/dot</i>	IV型蛋白分泌システム	Mol Microbiol 2001; 42: 603.
酸素依存性殺菌に抵抗	<i>mip</i>	24-kDa塩基性蛋白	Infect Immun 1989; 57: 1255.
	<i>sodC</i>	Cu, Zn-SOD	Jpn J Med Sci Biol 1996; 49:168.
細胞内増殖	<i>icm/dot</i>	IV型蛋白分泌システム	Science 1998; 279: 873.
細胞からの脱出(再感染)	<i>icmT</i>	ファゴソーム膜にポア形成	Mol Microbiol 2002; 43: 1139.
遺伝子発現調節(分化)	<i>relA</i>	ppGpp合成酵素	Mol Microbiol 1999; 33: 721.
	<i>letA/letS</i>	二成分制御系	Mol Microbiol 2002; 44: 107.
	<i>letE</i>	二成分制御系で転写・翻訳を調節するRNA	Mol Microbiol 2002; 44: 107.
	<i>rpoS</i>	静止期RNAポリメラーゼ・シグマ因子	Mol Microbiol 2001; 40: 1201.
	<i>fljA</i>	鞭毛特異的RNAポリメラーゼ・シグマ因子	J Bacteriol 1997; 179: 17.
アポトーシス(細胞傷害)	<i>icm/dot</i>	IV型蛋白分泌システム	Infect Immun 2002; 70: 1657.

表1 *L. pneumophila*の病原性に関与する主な遺伝子とその産物

*3…通性細胞内寄生菌と偏性細胞内寄生菌

増殖に細胞内環境が必須でなく細胞外でも増殖可能であるが、食細胞に貪食されても細胞内殺菌をエスケープして増殖する菌を通性細胞内寄生菌と呼ぶ。レジオネラ以外に結核菌、ペスト菌、チフス菌などがある。一方、クラミジアやリケッチアは細菌であるが、ウイルスと同様に増殖に細胞内環境が必須である。このような菌は偏性細胞内寄生菌と呼ばれている。

*4…アポトーシス

細胞死の形態を顕微鏡下で観察すると、その死の原因により2つの違った形を示す。その1つはネクローシス(necrosis;壊死)、もう1つがアポトーシス(apoptosis)である。アポトーシスは個体・器官の発生と成熟にとって欠くことのできない、また細胞が発生した時点ですでにプログラムされた細胞機能の1つであり、種々の疾患での細胞死、薬剤による細胞死、さらには癌にも関わっている。

*5…TH1/TH2型サイトカイン

CD4陽性T細胞は免疫応答におけるヘルパー機能を担うため、TH(ヘルパーT細胞)群と呼ばれる。この細胞群は、機能的にTH1、TH2と呼ばれる2つのサブセットに分類される。TH1は主として産生したサイトカイン(IL-2、IFN- γ 、TNFなど)を介してマクロファージを活性化し、細胞性免疫能を上昇させる。一方、TH2はB細胞の分化成熟から免疫グロブリン産生までをサポートするサイトカイン(IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13など)を介して液性免疫能を上昇させる。

害、それに続く細胞内小器官の集合には、Icm (intracellular multiplication) /Dot (defects in organelle trafficking) トランスポーターと名付けられた菌の分泌システムが深く関与している。Icm/Dotトランスポーターを介して何らかの分子(群)が菌側からM ϕ 内へ分泌されて送り込まれ、M ϕ 機能の攪乱(ファゴソームの酸性化阻害、ファゴソームとリソソームとの融合阻害、細胞内小器官の集合)が引き起こされると考えられている。Icm/DotトランスポーターによりM ϕ 内へ送り込まれる分子として、現在のところ20種を超える蛋白が報告されている^{2,5)}。しかしながら、細胞内増殖や細胞内小器官の集合を誘導することが直接的に証明された単一の蛋白は現在のところ見当たらない。これはエフェクター分子の冗長性によるものかもしれないし、未知のエフェクター分子がある可能性も高い。

一方、形態学的に細胞内で盛んに増殖中の菌には鞭毛が観察されないが、細胞内増殖後期および、感染細胞を殺して細胞外に出てきた菌には鞭毛が観察される。前者はReplicative form、後者はTransmissible formと呼ばれている。これら2つの形態の菌は染色性、呼吸活性、細胞壁の形態的構造、運動性、細胞への感染性、酸に対する感受性などが異なっていることが明らかにされ^{6,7)}、*L. pneumophila*は*Coxiella burnetii*の大型細胞-小型細胞、*Chlamydia spp.*の基本小体-網様体のように分化する菌であることがわかってきた。興味深いことにSturgill-Koszyckiら⁸⁾は、細胞内増殖後期のリボソーム付着ファゴソームは酸性化し、リソソームが融合すること、Transmissible formに分化した

菌はリソソームが融合しても殺菌されずに生存・増殖することを報告している。*L. pneumophila*はリソソームとファゴソームの融合を遅らせ、その間に細胞内で増殖し分化することでファゴリソームの形成による殺菌機構からエスケープしているようである。この細胞内増殖様式は、分化することによりファゴリソーム内で増殖する*C. burnetii*や*Leishmania spp.*に非常によく似ている。*L. pneumophila*は通性細胞内寄生菌^{*3}であるが、生体内では偏性細胞内寄生菌^{*3}のごとく振る舞っているように思える。*L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌もicm/dot相同遺伝子を保有しており⁹⁾、*Legionella dumoffii*では細胞内増殖に関与していることが明らかにされている¹⁰⁾。

2. アポトーシスの誘導による細胞傷害能

*L. pneumophila*がM ϕ 内で増殖を開始する以前の感染1~8時間という急性期にM ϕ および肺胞上皮細胞にアポトーシス^{*4}が誘導されることが報告され¹¹⁾、レジオネラ肺炎患者の強い低酸素血症や急性呼吸促進症候群(ARDS)などの臨床症状を説明するメカニズムの1つとして注目されている¹²⁾。

Tatedaら¹³⁾は、レジオネラ肺炎マウスを高酸素状態におくとマウス肺におけるアポトーシスが著明に更新し死亡率が有意に上昇することを見出し、レジオネラ肺炎発症病態におけるアポトーシスの重要性を報告している。

アポトーシスの誘導には既述のIcm/Dotトランスポーターの存在が必須であるが¹⁴⁾、アポトーシス誘導分子(群)はまだ同定されていない。未知のアポトーシス誘導分子(群)により、M ϕ のCaspase 3が活性化される¹⁵⁾、

Mitochondrial death pathwayが活性化する¹⁶⁾などの報告がなされている。Arakakiら¹⁷⁾は*Legionella longbeachae*もMφにアポトーシスを誘導することを報告している。

3. 肺胞上皮細胞内増殖能

肺胞上皮細胞内増殖能はレジオネラ肺炎の病態を修飾している。*L. dumoffii*は肺胞Mφだけでなく肺胞上皮細胞に高率に感染し増殖するため、肺炎の進行が早く劇症化すると考えられている¹⁸⁾。*L. pneumophila*において、Higaら¹⁹⁾は、細菌特有の情報伝達系である*ptsP* (phosphoenolpyruvate phosphotransferase) 遺伝子の変異株ではII型肺胞上細胞内での増殖能および細胞傷害活性が失われており、モルモットへの病原性も親株に比べ低くなることを報告している。

宿主側因子

1. レジオネラの細胞内増殖を制御する宿主側の遺伝子 *Lgn1*

*L. pneumophila*はA/JマウスのMφ

内では増殖するが、C57BL/6など多くのマウス系統のMφ内では増殖しないというMφ側のマウス系統差がある。この現象は*Lgn1*と名付けられたMφの遺伝子により支配されている²⁰⁾。*Lgn1*はマウスでは第13染色体上にあり、ヒトではそのシンテニー (synteny) は第5染色体上に位置しており、*Lgn1*は神経細胞のアポトーシスに関与する*Naip* (Neuronal apoptosis inhibitory protein) 遺伝子であることが明らかになった。この部位には多様性に富む*Naip*遺伝子が5つ反復して並んでおり、そのうち*Naip5*がMφ上に発現・機能していることが判明した²¹⁾。アポトーシスと*L. pneumophila*のMφ内増殖コントロールおよび上述の細胞傷害性との関連が示唆されている。

2. TH1型サイトカイン応答

レジオネラに対する感染防御機構としてTH1型サイトカイン応答が重要である。レジオネラ肺炎患者の血清中のTH1/TH2型サイトカイン^{*5}を測定した報告²²⁾によると、IFN- γ 、IL-12といったTH1型サイトカインの産生誘導

が多くの患者において認められ、IL-4、IL-10などのTH2型サイトカインはほとんど検出されない。マウスを使用したレジオネラ感染実験において、老齢マウスでは若齢マウスに比べてTH1型サイトカインであるIFN- γ の産生能が低く、レジオネラ感染に感受性が高いことが示されている²³⁾。レジオネラ肺炎患者は50歳以上の中高齢者に多いことに関与していると思われる。

おわりに

レジオネラの病原性発現に特に重要な因子について、細菌側と宿主側の両側より解説した。細菌側の因子として、①Mφ内増殖、②アポトーシスによる細胞傷害、③肺胞上皮細胞内増殖について述べ、宿主側の因子として、①自然抵抗性遺伝子*Lgn1*、②TH1型サイトカイン応答について概説した。

参考文献

- 1) Tilney LG, Harb OS, Connelly PS, Robinson CG, Roy CR. How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* 2001; 114: 4637-50.
- 2) Nagai H, Kagan JC, Zhu X, Kahn RA, Roy CR. A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* 2002; 295: 679-82.
- 3) Conover GM, Derre I, Vogel JP, Isberg RR. The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the DoVlcm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol Microbiol* 2003; 48: 305-21.
- 4) Luo ZQ, Isberg RR. Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* DoVlcm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 841-6.
- 5) Chen J, de Felipe KS, Clarke M, Lu H, Anderson OR, Segal G, Shuman HA. *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* 2004; 303: 1358-61.
- 6) Faulkner G, Garduno RA. Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 2002; 184: 7025-41.
- 7) Garduno RA, Garduno E, Hiltz M, Hoffman PS. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun* 2002; 70: 6273-83.
- 8) Sturgill-Koszycki S, Swanson MS. *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp*

- Med 2000; 192: 1261-72.
- 9) Morozova I, Qu X, Shi S, Asamani G, Greenberg JE, Shuman HA, et al. Comparative sequence analysis of the *icm/dot* genes in *Legionella*. *Plasmid* 2004; 51: 127-47.
 - 10) Ohnishi H, Mizunoe Y, Takade A, Tanaka Y, Miyamoto H, Hara-da M, et al. *Legionella dumoffii* DjlA, a member of the DnaJ family, is required for intracellular growth. *Infect Immun* 2004; 72: 3592-603.
 - 11) Gao LY, Abu Kwaik Y. Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infect Immun* 1999; 67: 862-70.
 - 12) 齋藤一博, 山口恵三. レジオネラの臨床細菌学・病原性・診断法. 化学療法の領域 2004; 20: 554-61.
 - 13) Tateda K, Deng JC, Moore TA, Newstead MW, Paine R 3rd, Kobayashi N, et al. Hyperoxia mediates acute lung injury and increased lethality in murine *Legionella* pneumonia: the role of apoptosis. *J Immunol* 2003; 170: 4209-16.
 - 14) Zink SD, Pedersen L, Cianciotto NP, Abu-Kwaik Y. The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infect Immun* 2002; 70: 1657-63.
 - 15) Molmeret M, Zink SD, Han L, Abu-Zant A, Asari R, Bitar DM, Abu Kwaik Y. Activation of caspase-3 by the Dot/Icm virulence system is essential for arrested biogenesis of the *Legionella*-containing phagosome. *Cell Microbiol* 2004; 6: 33-48.
 - 16) Neumeister B, Faigle M, Lauber K, Northoff H, Wesselborg S. *Legionella pneumophila* induces apoptosis via the mitochondrial death pathway. *Microbiology* 2002; 148: 3639-50.
 - 17) Arakaki N, Higa F, Koide M, Tateyama M, Saito A. Induction of apoptosis of human macrophages *in vitro* by *Legionella long-beachae* through activation of the caspase pathway. *J Med Microbiol* 2002; 51: 159-68.
 - 18) Maruta K, Miyamoto H, Hamada T, Ogawa M, Taniguchi H, Yoshida S. Entry and intracellular growth of *Legionella dumoffii* in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1967-74.
 - 19) Higa F, Edelstein PH. Potential virulence role of the *Legionella pneumophila* *ptsP* ortholog. *Infect Immun* 2001; 69: 4782-9.
 - 20) Yoshida S, Goto Y, Mizuguchi Y, Nomoto K, Skamene E. Genetic control of natural resistance in mouse macrophages regulating intracellular *Legionella pneumophila* multiplication *in vitro*. *Infect Immun* 1991; 59: 428-32.
 - 21) Wright EK, Goodart SA, Growney JD, Hadinoto V, Endrizzi MG, Long EM, et al. *Naip5* affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Curr Biol* 2003; 13: 27-36.
 - 22) Tateda K, Matsumoto T, Ishii Y, Furuya N, Ohno A, Miyazaki S, et al. Serum cytokines in patients with *Legionella* pneumonia: relative predominance of Th1-type cytokines. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5: 401-3.
 - 23) Fujio H, Kawamura I, Miyamoto H, Mitsuyama M, Yoshida S. Decreased capacity of aged mice to produce interferon-gamma in *Legionella pneumophila* infection. *Mech Ageing Dev* 1995; 81: 97-106.

IV. 研究成果の刊行物・別刷

3. 環境中のレジオネラとレジオネラ症の迅速かつ網羅的
遺伝子診断法に関する研究

ゲノム情報を使った 感染症の網羅的診断法



江崎 孝行
岐阜大学大学院医学研究科教授

これまでに、微生物のゲノム情報をどう解析するかという話が続きましたが、私は、現在までに分類学上正式に記載されている約5,500種の細菌の情報を、どのように感染症の診断に利用するかという話をします。

感染症の診断と病原細菌の同定

5,500種の細菌のなかでヒトに病気を起こす細菌性病原体は約900菌種で、そのうちもっとも危険度の高いレベル3の菌種としてチフス菌、炭疽菌、ペスト菌および結核菌などに代表される33菌種が、レベル2およびレベル1で、日和見病原体といって通常は病気を起こさず免疫力が落ちたときに感染を起こすものをいれて約900種に達します。そのなかで、菌類では50類ほど、病原性ウイルスとしては110種ほどを対象とした感染症診断法を開発することを目標に、私どもは研究を進めています。

医師が発熱した患者さんを前にして診察をするとき、これだけの病原体が対象となるため、原因菌を同定することは、かなりの経験を積んだ医師でも容易ではありません。そこで、従来は検体を採取して検査をしていました(図1)。下痢をしているのであれば、下痢便を採取して1日から数日かけて培養し、そ

れをもとに同定作業を行います。この同定作業も1日から数日かかります。結核菌だと培養に1か月ほど、同定作業にさらに数週間かかります。このように長い時間がかかると、患者さんの病気が治った後に結果がでたり、運が悪いと重篤化して初めてわかるため、感染症の診断・治療にはあまり役立ちません。

いち早く病原体を特定し、その病原体に特異的に効く抗生物質を最初から選択することができれば、治療が的確になり、無駄な抗生物質を使う高額な治療費の浪費を抑えることができます。

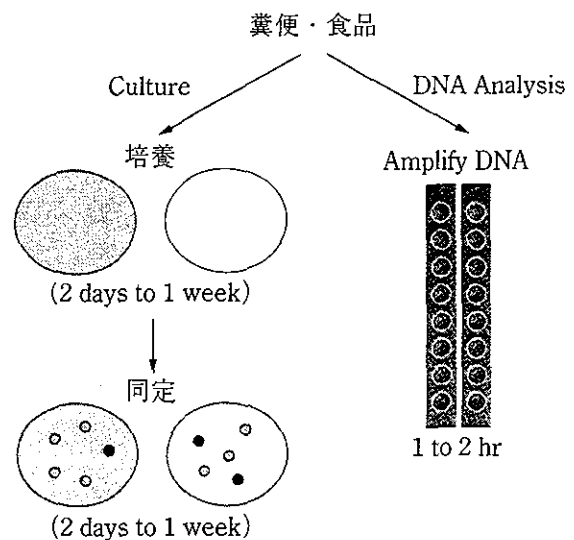


図1 培養検査と遺伝子検査の比較

このような視点に立って、私どもは主要なヒト感染症のうち、下痢症、気道感染、敗血症、髄膜炎、性感染症、眼科領域、皮膚感染などにわけ、これらの病気を起こす病原体を網羅的に迅速に解析する方法を作成しています。

感染症診断法の問題点

ところで、病原体のなかで通常の培地で培養できるものは、ごくかぎられています。たとえば、呼吸器感染症の場合、通常の培養で引っかかる病原体と、熟練した検査技師が特殊な培地を使って初めて同定できるもののがかなりありますが、それでも通常の培養では培養できない病原体が多くなっています。ウイルスになると、インフルエンザウイルスのよ

うな特殊なごく一部の抗原検査が外来などでできるようになってはいますが、通常は組織培養というやっかいな方法でなければ分離できないため、病院などではそのような検査をまったく行っていません。

皆さんが熱がでて病院にいったとき、検体をだすと、すべての感染症の病原体が調べられているものと考えがちですが、現実には、すべてを検査できないのが実情です。保険診療ではすべてを調べることはできません。医師が指定したときは特殊な検査を行います。それ以外は通常の数少ない培地を使って、頻度の高いものだけが検査対象となります。頻度の低い疾病、たとえば1年に1回しか見つからないような疾病や、外国にしかないような疾病、ウイルスは通常検査の対象外です。

階級に応じた細菌の同定

新しい感染症の診断法には遺伝子情報を使います。大腸菌の場合、ゲノムは460万塩基対ほど、ヒトはその1,000倍ほどあります。そこで、すべてのゲノムを対象に使うことは無理があるため、大腸菌のゲノムのなかの、どの情報を使うかが問題になります。大腸菌の菌株によってもゲノムサイズは違いますし、大腸菌以外の菌種によってもさまざまです。また、遺伝子の数も数百から数千とかなりのひらきがあります。

15年ほど前から、真核生物に共通な16SリボソームRNA(16S rRNA)の遺伝子配列を使って微生物を分類する方法がさかんになり、そのデータが蓄積されてきました。そのデータをもとにすると、地球上の生物は3つのドメインに大別することができます(図2)。細菌(Bacteria)と古細菌(Archaea)、真核生物(Eukaryotes)です。この真核生物のなかに、原虫、カビ、動物、植物が分類されます。この16S rRNA(真核生物は18SリボソームRNA)の配列情報をもとに作成した系統樹を使うと、細菌性の病原体をほぼ同定することができます。

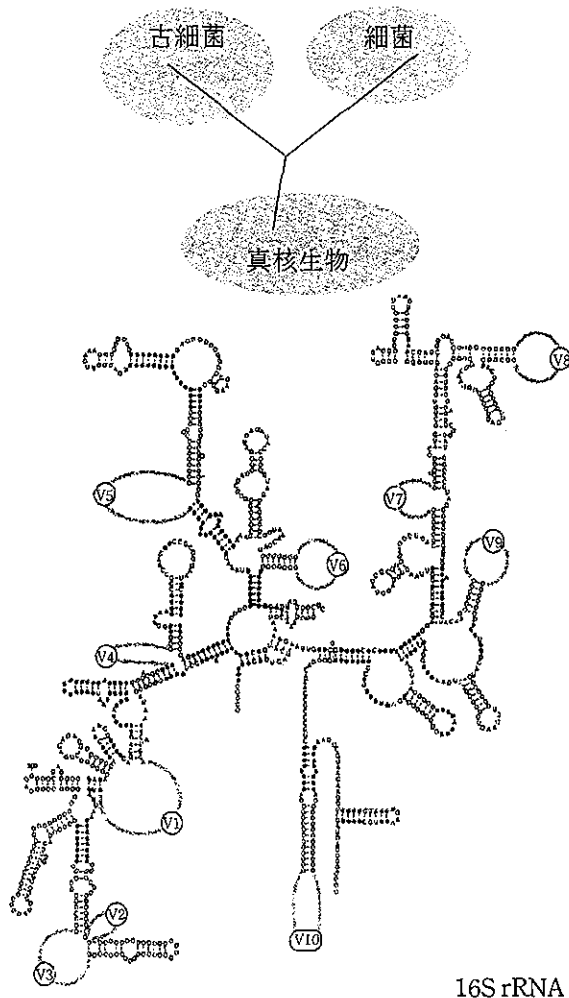


図2 生物のリボソームによる系統分類 図中のVは配列が菌種によって異なる

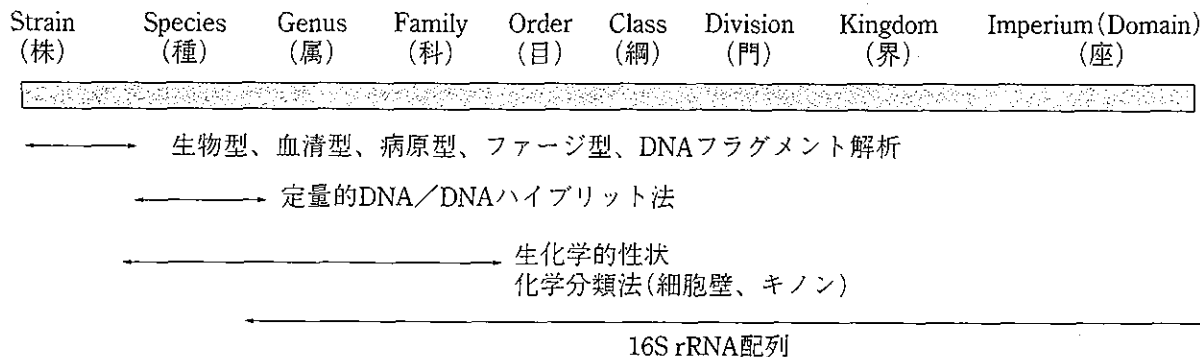


図3 分類階級と使用される指標

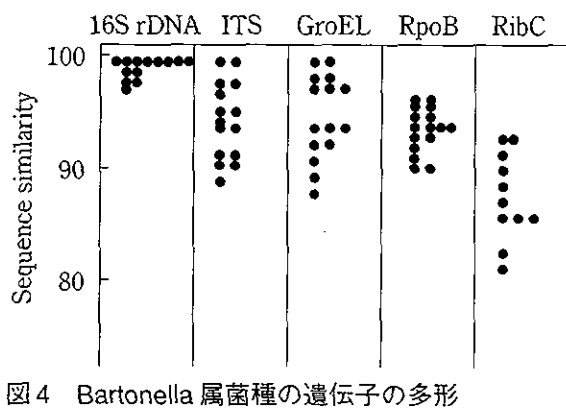


図4 Bartonella 属菌種の遺伝子の多形

表1 菌種の定義の変遷

<ul style="list-style-type: none"> ・ 少ない生化学的性状で病原菌を同定し分類した ・ 血清型による分類： 連鎖球菌、サルモネラ ・ 数値分類： 多数の性状を調べて分類同定 ・ 化学分類： 安定な細胞壁、Quinone、GC %、脂質 ・ リボソーム配列とDNA/DNAハイブリッド法
--

す。

微生物の分類は、分類段階によって使う情報が違いますが、現在、16S rRNA 配列で微生物の高次分類から菌種に近いところまで分類するシステムが確立しています(図3)。そして、この15年間の研究の過程で、この方法論の利点と欠点も明らかになっています。図4は、Bartonella 属の菌種の16S rRNA 配列を比較したのですが、ほとんどが同じ配列となります。つまり、16S rRNA 配列では、Bartonella 属の菌種を識別することはできません。この16S rRNA にかわるものとして、23S リボソーム RNA の配列と、タンパク質、RNA ポリメラーゼなどが候補にあがってきています。他の遺伝子配列をみると16S rRNA より配列に多様性があることから、識別能力があります。GroELでも同じです。

病原細菌の同定法

これまでに、菌種の定義が変遷してきました(表1)。現在では、種の同定にリボソーム

配列とDNA/DNAハイブリッド法を使っています。この定義に基づいて病原細菌を同定する場合、16S rRNA だけでは無理で、さらに細かい候補遺伝子、特に病原菌の場合は病原性因子、毒素をつくるかつくらないか、組織に侵入するかしないかなどを検出のターゲットにして検出系を組むようにします。私たちが目標としているのは、患者さんが来院して検体を採取して、あるいは入院患者さんから朝の検査で検体を採取して、その結果を次の日、理想をいえば2~4時間でだせるようなシステムを開発することです(図5)。そのためは、遺伝子を抽出し、その遺伝子を特異的にふやす方法が必要になります。

図5に示す方法であれば、臨床材料から病原体の遺伝子を抽出して遺伝子を増幅するまでに約1時間です。抽出作業に約30分、もっとも早い遺伝子の増幅方法だと、1個の遺伝子を100万個までふやすのに10~15分ですみます。そして、病原体を決める際に、約1,000種の病原体すべてを対象とすることは物理的

に不可能であることから、病原性の強いものは遺伝子増幅方法でいっきに確定し、病原性の弱いものは属レベル、ファミリーレベルで捕まえるようにして、遺伝子を増幅する試薬の種類を極力減らす工夫をしています。

ここで遺伝子をグループで増幅する方法を使った場合、識別が必要となりますが、それにはDNAチップを使います。DNAチップには病原体のリボソームの配列と病原因子を固定します。それと1時間ほどグリッドをつくらせ、レーザーสキャナーでみたり、蛍光顕微鏡、CCDカメラで捕まえる方法を使っています。

DNA増幅キットの開発

喀痰の病原体を調べるとき、普通は、細菌とカビを対象にしますが、ウイルスの場合はRNAウイルスとDNAウイルスが混在しているため、抽出方法、増幅方法がかわります。ここにいろいろな病原体があり、この数を見ると20いくつかはかはいっていませんが、ここに遺伝子を増幅するための試薬セットが16個はっています。ただし、病原体には900菌種もあるため、これではすべてを増幅できないのではないかと考えるかもしれませんが、ひとつの属の菌種をまとめて増幅するような試薬をいれています。たとえば、Chlamydiaのプライマーはクラミジア属の菌なら何でも増

幅することができます。さらに、ひとつのなかに何種類かの遺伝子増幅試薬をいれることで、ウエル数を減らします。このなかには3種類ほどの試薬がはいっていますが、これを増幅した後、電気泳動にかけると増幅したDNAフラグメントの違いがでて、その長さを測定することで、どの病原体の遺伝子が増幅したかがわかります。

ただし、このようなグループプライマリーで増幅したものは、さらにマイクロアレイなどを使って細かな種の識別をするようにします。

下痢でも同じようなことがいえます。その場合、呼吸器疾患とは違って16S rRNAをほとんど使わず、病原因子を使って検出します(図6)。

病原体遺伝子の抽出法

ほとんどの細菌検査室では、検査費削減のために遺伝子の増幅機を使い、電気泳動で得たフラグメントで識別しています。費用に少し余裕がある施設では、フラグメントをさらに細かくDNAチップで読みとったり、さらに余裕のある施設ではリアルタイムで増幅をモニタリングして病原体数を測定しています。

このような方法でもっとも重要な点は、病原体の遺伝子の抽出法です。細菌の場合、グラム陽性菌とグラム陰性菌でDNAの壊れ方が違います。芽胞をもつ菌は壊れにくいので、

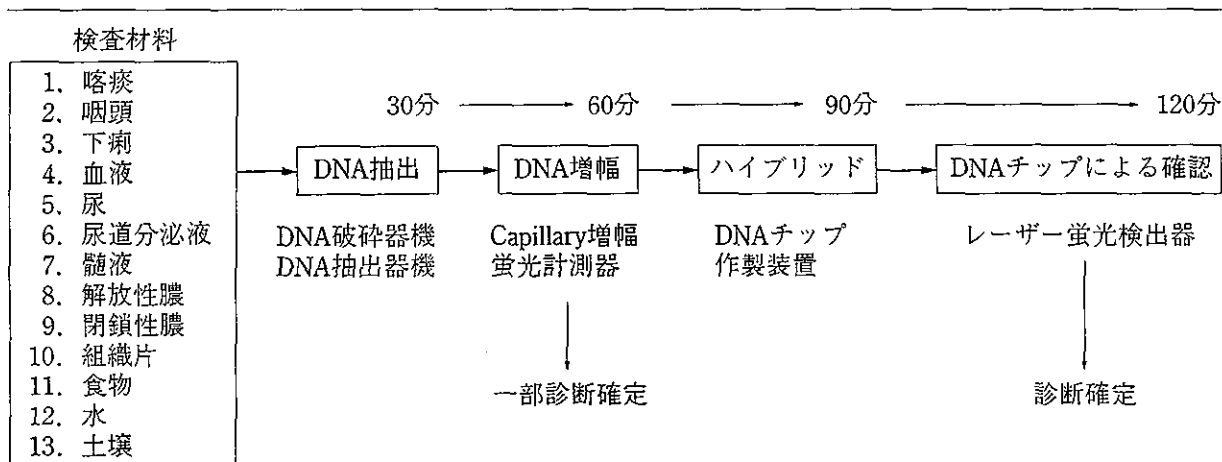


図5 迅速な遺伝子診断

下痢病原体

どの病原体も同じレベルで破碎しなければなりません。私たちはジリコニアビーズというガラスビーズより密度が2倍ほど高いビーズを使って、菌体を物理的に破碎しています(表2)。また、タングステンビーズはジリコニアビーズの約2倍の密度があるので、さらに強力な破碎ビーズになります。これを使うと、ほとんどの菌がほぼ100%に近い状態で壊れます。

ちなみに、タングステンビーズがもっとも破碎効率がよいのですが、純度の高いタングステンビーズの入手は容易ではありません。

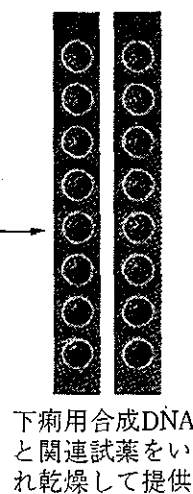
純度のよいものは高価で、臨床の場ではなかなか使えません。現実的には、ジリコニアビーズを使って物理的に破碎してDNAを抽出しています。

尿道炎の病原菌の同定

しかし、検体によっては簡単な方法で病原体遺伝子の抽出が可能です。たとえば、尿道炎で性病科にきた患者さんの尿道分泌物を蒸留水に浸して3分間ほどボイルした液の一部を遺伝子増幅試薬に加えると、約15分後には、遺伝子が増幅したものをモニタすることができます(図7)。20~40サイクルで遺伝子が増幅するため、サンプリングしてから30分以内に答えがでます。そのため市中の医院でも使えると考えています。

実際の尿道炎では、病原体の種類は非常に

Aeromonas hydrophila Enterotoxin	Helicobacteri spp. 16S rDNA
Bacillus anthracis Protective antigen	Shigella spp. IpaB
Bacillus cereus group Haemolysin	Staphylococcus aureus SEA
Bacteroides fragilis fragilysin	Staphylococcus aureus SEB
Campylobacter jejuni t CdtA toxin	Staphylococcus aureus SEC
Clostridium botulinum NTNH	Staphylococcus aureus SED
Clostridium difficile toxin A	Staphylococcus aureus SEE
Clostridium difficile toxin B	Vibrio cholerae CT
Clostridium perfringens Cpe toxin	Vibrio parahaemolyticus / (Tdh)
Escherichia coli (EaggEC) EAST-1	
Vibrio vulnificus 16S rDNA	
Escherichia coli (EaggEC) pCVD432	Yersinia pestis Pesticin
Escherichia coli invasive virB	Tropheryma whipperi
Escherichia coli intimin (eae)	Giardia lambria 18S rDNA
Escherichia coli LT (ETEC)	Cryptosporidium parvum antigen gene
Escherichia coli Shiga Toxin (EHEC)	Entameba histolytica antigen gene
Escherichia coli ST1 (ETEC)	Hepatitis A
Escherichia coli ST II	Hepatitis E
Listeria monocytogenes HylA	Adenovirus
Mycobacterium spp. 16S rDNA	Enterovirus
Plesiomonas shigelloides 16S rDNA	SARS virus
Salmonella typhi VipR	Calici virus
Shigella spp. virG2 (IcsA)	Rota virus



下痢用合成DNAと関連試薬をいれ乾燥して提供

図6 多数の下痢病原体の遺伝子検査

表2 細菌を破壊する共通のプロトコール

	酵母菌 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	コメコウジカビ (<i>Aspergillus oryzae</i>)	枯草菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
ガラスビーズ	38 %	29 %	42 %
ジリコニアビーズ	88 %	66 %	81 %
タングステンビーズ	99 %	92 %	96 %

少ないため、15種類の病原体をふやす試薬セットをつくって、すべての性病の病原体をモニタする方法を開発しています(表3)。

すべての菌を増幅するようなプライマリーをつくって、まだ尿道炎を起こすことが学問的に確定されていない細菌の遺伝子を増幅し、それをさらにチップで解析することで、新たな尿道炎の病原体を同定する方法論を構築しています。

ただし、ひとつのウエルのなかに何種類もの試薬をいれているので、遺伝子が増幅したことがモニタリングでわかっても、電気泳動でそのサイズを調べる必要があります。たとえば、図8の場合、340塩基のDNAフラグメントがふえただけでは、どの細菌の遺伝子が増幅したのかはわかりません。これをマイクロアレイと反応させて細かく識別するように

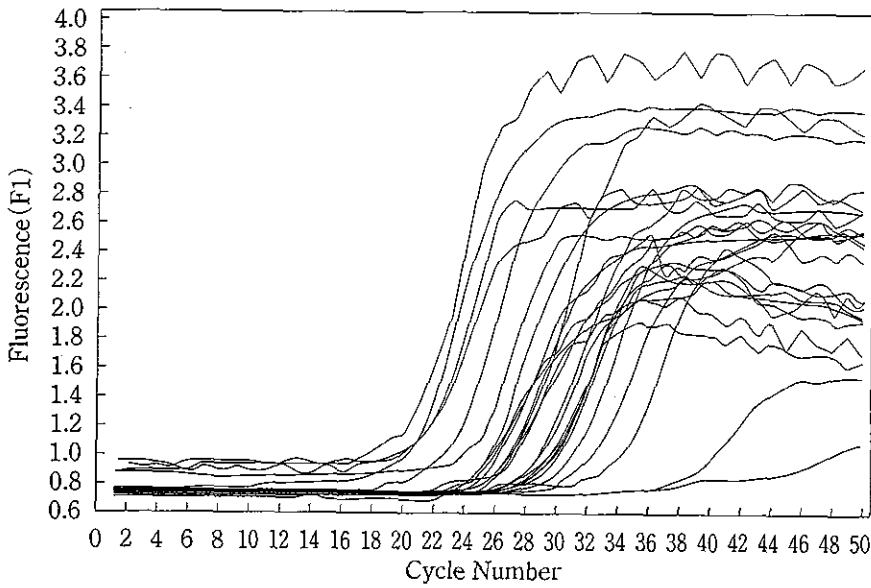


図7 尿道炎の Real Time PCR

表3 尿道炎を起こす病原体の遺伝子検査法の標的遺伝子

病原体	遺伝子
1. <i>Bacteroides ureolyticum</i>	16S rDNA
2. <i>Chlamydia trachomatis</i>	MOMP
3. <i>Haemophilus ducreyi</i>	16S RNA
4. <i>Haemophilus influenzae</i>	16S rDNA
5. <i>Mycoplasma fermentans</i>	IS like element
6. <i>Mycoplasma genitalium</i>	Adhesin antigen
7. <i>Mycoplasma hominis</i>	16S rDNA
8. <i>Mycoplasma pneumoniae/genitalium</i>	16S rRNA
9. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	16S rDNA
10. <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	16S rDNA
11. <i>Treponema pallidum</i>	47KDa gene
12. <i>Treponema pallidum</i>	16S rDNA
13. <i>Trycomonas vaginalis</i>	B-TUBULIN
14. <i>Ureaplasma ureolyticum</i>	16S rDNA
15. Herpes simplex I-II	DNA polymerase

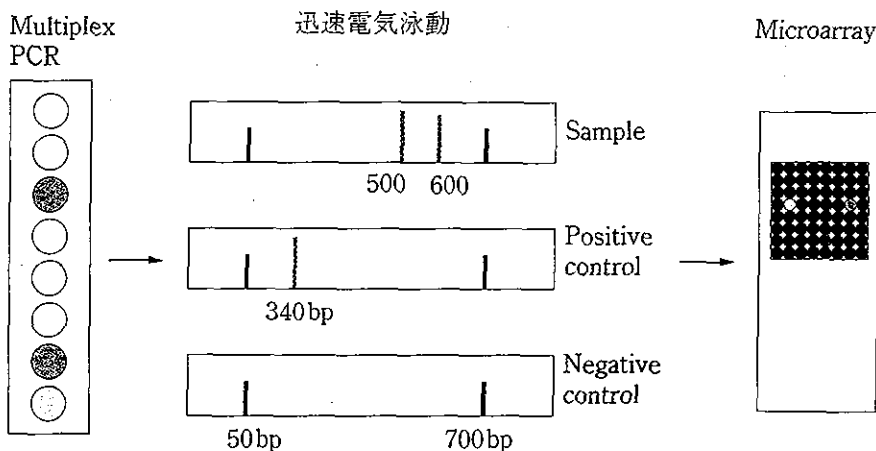


図8 遺伝子増幅と迅速電気泳動

します。

マイクロアレイは、ひとつの細菌の全ゲノムのマイクロアレイと違って、菌種に特異的な配列がはいっていて解析が楽です。図9の一番左は、*Mycobacterium* アレイの *M. bovis* で、同じスポットが3つ特異的に反応しています。ところが、右の *M. kansasii* や *M. goodii* は反応せず、16S rRNAの配列が非常に近いものはときどき識別が難しくなりますが、スポットの強さをみれば定量が簡単であることがわかんと思います。

さらに幅広く900種類ほどをマイクロアレイに固定したときのデータを図10に示します。性病を起こすクラミジアの場合、特異的に反応します。

図11は、白血球のなかの細菌の遺伝子を増幅してマイクロアレイと反応させたところ、*Ehrlichia sennetsu* のシグナルがでてきました。通常は培養できないため培養検査の対象にはなりません。ユニバーサルプライマーという、微生物を何でもふやす遺伝子増幅試薬を使うと、ときどき引つ

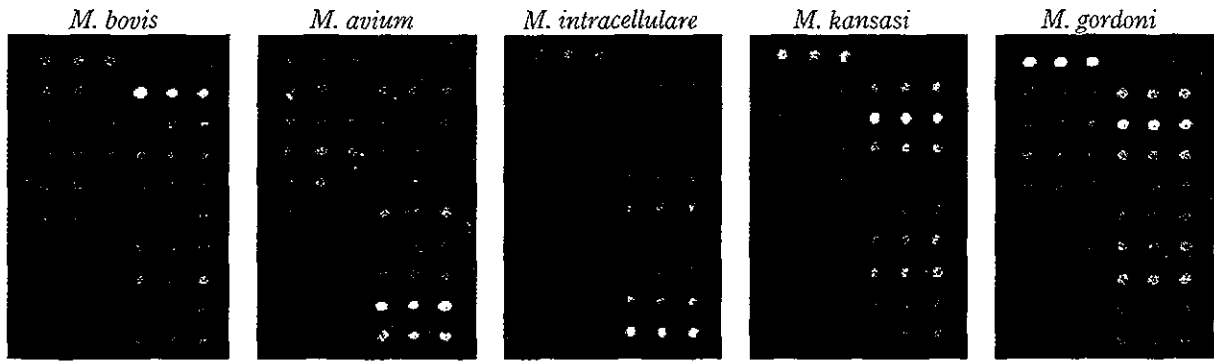


図9 Mycobacterium 属菌の DNA アレイ

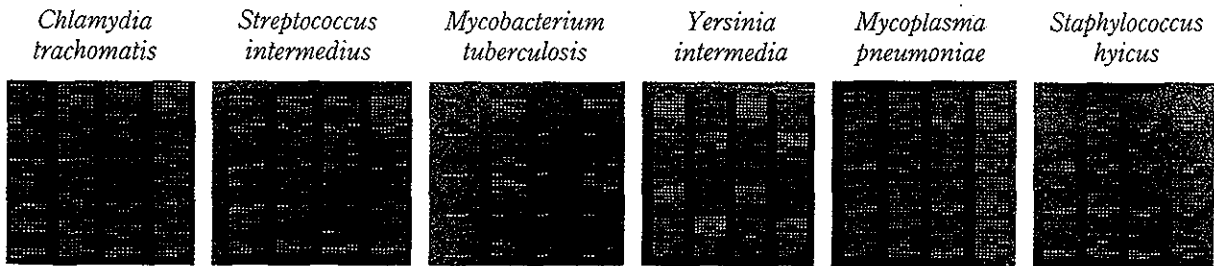


図10 リボソームを使ったマイクロアレイ (口絵カラー参照)

かかることがあります。

新しい システムの構築

もう一度振り返ってみます。菌体を破碎してDNAを抽出する操作、遺伝子をふやすための試薬セットを準備しリアルタイムで遺伝子が増幅するのをモニタリングする、増幅したものをマイクロアレイ

に反応させて、それをレーザースキャナーでスキャンする工程があります。おのおのの工程で高価な機械を使います。たとえば、リアルタイムでモニタリングするような機械は高価ですし、レーザースキャナーも高価です。貧乏な細菌の検査室ではなかなか、このような装置を導入してもらえません。

そこで、私たちがもっとも力をいれているのは、もう少し安価で実用的なシステムを開発することです。私どもは、縦横8mm角のファイバに約100種類の遺伝子をのせるように

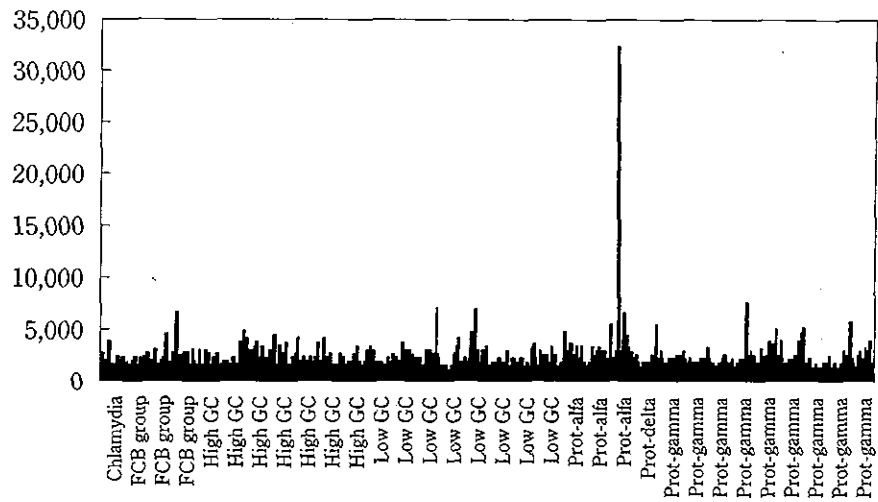


図11 白血球中の *Ehrlichia sennetsu*

しています(図12)。中空ファイバのなかにDNAを埋めこんで、それを100本なら100本のファイバを束ねた後、金太郎飴のように切断して、そのひとつをDNAチップとして使うようにします。シリコンアレイとしては3mm角のものを使っています。

図13は、実際にファイバアレイでだしたデータで、下痢の病原体です。これがそのときの実際の画像です。同じものを2つのせてあります。

この方法で、赤痢菌の virG やエロモナスと

- 3) 江崎孝行：病原細菌の遺伝子解析、ウイルス・細菌と感染症がわかる、28-35 (羊土社、2003)
 4) 江崎孝行：遺伝子診断とDNAチップ、新医療5、

143-144、2003

- 5) 江崎孝行：ゲノム情報を利用した感染症診断、ゲノム医学 Vol.3、111-118 (メヂカルレビュー社)

Q & A

■ Q ■

薬剤感受性にゲノムを使った診断について、薬剤感受性のデータが得られませんがどうしていますか。

● A ●

感受性の情報をすべてゲノムの情報だけで予測することはできないので、当分の間、培養検査は生き残ると思います。診断で使っているDNAチップは、病原菌の場合はほとんどがオリゴを使っています。すべてオリゴにしたいのですが、環境中にはフローラの解析が未知の菌がたくさんいるため、それを捕まえるためにcDNAも使っています。

■ Q ■

高額な医療費を抑えることが可能となれば、患者にしてみれば喜ばしいものの、それで利益が下がれば新しい研究ができなくなります。そのバランスはどうしていますか。

● A ●

今後、定額医療が定着すると、いかに薬を少なく使って、早く患者さんを治療するかが、医療上、重要になります。その意味では貢献できると考えています。

■ Q ■

ユニバーサルプライマーを使うと、メジャーなものだけしか捕まらないのではないのでしょうか。

● A ●

実際、糞便などでユニバーサルプライマーを使うと、うまくいって糞便全体の0.1%ほどまでのフローラしか捕まえられません。ユニバーサルスペシフィックグループプライマーを組合わせて、フローラの解析に使っています。

■ Q ■

シリコンアレイやファイバアレイの検出法はどうするのですか。

● A ●

ガラスアレイの場合、レーザーキャナーを使います。シリコンアレイとファイバアレイの場合、CCDカメラを使うか、一番安く使える蛍光顕微鏡での観察を考えています。

■ Q ■

DNAチップを、電気泳動する前に用いれば早くなると思いますが、できない理由は何ですか。

● A ●

リアルタイムでモニタリングできる場所は、そのまま

DNAチップを使います。リアルタイムの機械をもっていない施設は、電気泳動をして、そのフラグメントをみてからチップにあてるようにしています。

■ Q ■

ゲノム解析によって、種をあらためてわけるとか、一緒にするようなことはないのでしょうか。

● A ●

現在、全染色体の遺伝子の30%以内の多様性であれば、その株の集団は、ひとつの種と定義されています。それにかわるような定義はまだできていません。現在、5~10個のハウスキーピング遺伝子を数個選んで、その多様性を比べることで種を決める動きがでてきています。5個でよいのか10個でよいのか、まだコンセンサスが得られていません。ただし、ゲノムの情報が蓄積されれば、種を決める新しい概念ができると思います。16S rRNA データが蓄積して種の系統の概念ができあがるのに15年ほどの年月がかかりました。これからさらに蓄積していけば、10年後、20年後には新しい種の概念ができるかもしれません。

第9章 DNAマイクロアレイを用いた 環境サンプル中の微生物群集の解析

江崎孝行*¹, 大楠清文*², 河村好章*³

環境中のサンプルの微生物を解析する際、細菌だけを取り上げても数百万種といわれる未知の生物をどのように捕捉して解析するかは難しい課題である。そのうち特定の微生物に限定した解析は現在では遺伝子を検出する手法を使えば比較的容易にできる。しかし採取した環境にどのような微生物が生息するかを予測できない場合、網羅的に解析する必要が出てくる。すべての系統の微生物を培養方法で解析することは実質的に不可能なので我々は、16S rDNA で系統分類が整理されてきた細菌を網羅的に検出するための方法の開発を行っている。まだ十分な環境の解析データが蓄積していないが汚染土壌の修復課程で修復前後の菌数の変動をモニターした例を使ってこの方法の利用方法を紹介する。

1 系統マイクロアレイの作成

細菌は分類学的には 約6,000種が正式に記載されており、約30のphylaに分布している。しかし環境中には数百万の未分類の細菌が生息しているといわれており、その多くは通常の培養では培養困難なため、配列の記載だけに留まっている。しかし数万件登録におよぶ未分類の菌種の16S rDNA のデータを見ても、未分類の菌株の多くは既存の分類群のどこかに所属し、新しい phylumを形成する菌株はきわめて少ない。

そこで我々は既存の6,000種が所属する約950属の主な構成菌種の16S rDNA配列を比較し、その属の菌種に比較的保存されている領域から40~50塩基長の配列を選択したoligoDNAを合成し

*¹ Takayuki Ezaki 岐阜大学大学院 医学研究科 再生分子統御学講座 病原体制御学分野
教授

* Kiyofumi Ohkusu 岐阜大学大学院 医学研究科 再生分子統御学講座 病原体制御学分野
助手

* Yoshiaki Kawamura 岐阜大学大学院 医学研究科 再生分子統御学講座 病原体制御学分野
助教授

表1 アレイに固定した配列の系統と属の数

系統	Oligo DNAを作成した属の数	
1	<i>Archaea</i>	66
2	<i>Actinobacteria</i>	134
3	<i>Firmicutes</i>	190
4	<i>Chlamydia</i>	8
5	<i>Cyanobacteria</i>	39
6	<i>CFB group</i>	42
7	<i>Alfa Proteobacteria</i>	121
8	<i>Beta Proteobacteria</i>	57
9	<i>Gamma Proteobacteria</i>	119
10	<i>Delta proteobacteria</i>	49
11	<i>Epsilon proteobacteria</i>	12
12	<i>Spiral bacteria</i>	19
13	<i>Fusobacteria</i>	12
14	<i>Deferribactera</i>	5
15	<i>Acidobacteria</i>	3
16	<i>Fibrobacter</i>	1
17	<i>Nitrospira</i>	2
18	<i>Nitrosomonad</i>	1
19	<i>Planctomyceta</i>	4
20	<i>Thermodesulfobacteria</i>	1
21	<i>Thermomicrobia</i>	1
22	<i>Verrucomicrobia</i>	2
23	<i>Aquifica</i>	5
24	<i>Thermotoga</i>	5
25	<i>Chlorobia</i>	4
26	<i>Deinococci</i>	3
27	<i>Chrysiogena</i>	1
28	<i>Chloroflexa</i>	5
29	<i>Dictyogloma</i>	1
Total		912

マイクロアレイに固定した (表1)¹⁾。

2 土壌のDNAの抽出

菌相の解析には様々な微生物のDNAを均等な条件で抽出する方法が必要になる。我々はこの目的のためにグラム陽性菌、菌類の細胞壁を破碎するために従来汎用されてきたガラスビーズを密度がガラスの2倍高い giriconia beads を使用して効率に破碎する方法を採用した¹⁾。土壌4gを36mlの50mM EDTA pH8.0に懸濁し、攪拌後、上澄み2mlをとり、微量の卓上遠心器12000gで5分間遠心した。上澄みを捨てた後1%SDS, 4Mのguanidiniumが入った溶菌液200μlを加え、さらに1gの giriconia beads を加え Multibeads Shocker (安井機器, 大阪) で破碎した。