

学 位 論 文 要 旨

氏名 西田 隆司

題 目 : Study on the Relationship between *Legionella pneumophila* and Host *Paramecium*
(レジオネラニューモフィラと宿主ゾウリムシとの関係に関する研究)

論文要旨 :

レジオネラ (*L. pneumophila*) はグラム陰性の通性細胞内寄生菌であり、ヒトのレジオネラ症の主な原因菌である。レジオネラ症には、重篤なレジオネラ肺炎と感冒様症状を起こすポンティアック熱の二つの病型が知られている。レジオネラは、自然環境水や土壌に広く生息する環境細菌であり、ヒトへの感染は菌を含んだエアロゾルを吸入することで成立する。また、自然環境中においては、アメーバをはじめとした様々な原生生物の中に存在すると考えられている。原生生物は環境中におけるレジオネラの増殖や生息域の拡大に寄与するものであり、ヒトへの感染リスクを増大させる要因となり得る。しかしながら、自然環境中におけるレジオネラの生態やアメーバ以外の原生生物との関係は十分には解明されていない。そこで、本研究では環境中から分離したレジオネラ株を用いその解析を行った。

まず、第 1 章では環境由来レジオネラ株からのプラスミドの分離とこれを利用したシャトルベクターの作製を行った。レジオネラに限らず多くの細菌の研究には遺伝子工学的な手法が必須であり、そのツールとしてプラスミドが種々のベクターとして使用されている。しかし使用されている多くのベクターは大腸菌由来のプラスミドを起源としており、安定性などに問題がある場合もある。レジオネラ由来のプラスミドはいくつか報告されているが、これらのプラスミドのサイズは数 10 kbp を超えており、ベクターとしては用いられていない。そこで山口県内から分離された環境由来株 5 株についてプラスミドの分離を試みた。その結果、2 株からプラスミドの分離に成功した。2 つのプラスミドのうち、レジオネラ Ofk308 株 (Ofk308) から分離したプラスミド (pOfk55) についてシーケンス解析を行い、その配列の確認を行った。次に pOfk55 に薬剤耐性遺伝子をレポーター遺伝子と導入し解析を行った結果、レジオネラ内でのプラスミドの複製に必要な領域が明らかとなった。この領域に大腸菌の *ori*、薬剤耐性遺伝子、*tac* プロモーターおよびマルチクロニングサイトをクロニングすることで、シャトルベクター pNT562 を得た。pNT562 の性質を確認したところ、他のレジオネラのベクターと比較して菌への導入効率が高く、すべてのレジオネラ株において複製することが確認された。また抗生物質を加えていない非選択圧下においても、pNT562 はレジオネラ内で長期間維持された。さらに、pNT562 に GFP 遺伝子をクロニングした pNT563 を作製し、レジオネラと大腸菌に導入したところ、安定して GFP の発現が確認された。以上の結果から pOfk55 を利用し作製したベクター pNT562 はレジオネラの遺伝子工学的解析のためのツールとして有用であることが示された。

第 2 章では、環境由来レジオネラ株である Ofk308 とその自然宿主としての *Paramecium tetraurelia* との関係の解明を行った。ゾウリムシ (*Paramecium spp.*) はレジオネラの自然宿主となり得ると考えられているが、詳細は明らかとなっていない。そこで本研究では、レジオネラの病原因子として知られている I 型分泌装置に注目し、レジオネラとゾウリムシとの関係における機能解析を行った。Ofk308 は一部のゾウリムシに対して毒性を示すことが報告されているため、まず、Ofk308 が *P. tetraurelia* に毒性を示すか確認した。その結果、MOI 依存的に毒性を示すことが明らかとなった。次にこの毒性に I 型分泌装置が関与するか検討するため、Ofk308 を親株として I 型分泌装置に関与する遺伝子の欠損株を作製したところ、*tolC* を欠損させた株では毒性が消失した。しかし、I 型分泌装置の他の構成タンパク等を欠損させても毒性は減弱せず、Ofk308 の毒性は I 型分泌装置ではなく TolC のみに依存することが示唆された。毒性を示すメカニズムを明らかにするために、ゾウリムシ細胞内の菌数および食胞とリソソームの融合について比較したが大きな違いは認められなかった。そこで、ゾウリムシの消化過程に注目し、食胞形成と菌の排出について比較を行った。その結果、Ofk308 を感染させた場合ではゾウリムシの食胞形成が阻害されたが、*tolC* 欠損株では阻害されなかった。さらに、ゾウリムシからの菌の排出も TolC 依存的に阻害されていることが確認された。これらの結果は、レジオネラのゾウリムシに対する毒性に TolC が関与し、かつレジオネラがゾウリムシ内に残存するために TolC が必要であることを示唆している。

レジオネラがゾウリムシの中に残存することは、その生息域の拡大に寄与すると考えられる。このような観点からも、原生生物との関係を含めたレジオネラの生態を解明することはレジオネラ症を制御する上で重要である。本研究は環境中のレジオネラに焦点をあて、その解析を試みたものであり、レジオネラの環境中の生態を解き明かすための一助となることが期待される。

学位論文審査の結果の要旨

| | |
|---------|--|
| 氏 名 | 西田 隆司 |
| 審 査 委 員 | 主 査：山口大学 教授 度会 雅久 |
| | 副 査：山口大学 教授 島田 緑 |
| | 副 査：JRA 競走馬総合研究所 研究役 丹羽 秀和 (客員教授) |
| | 副 査：山口大学 准教授 清水 隆 |
| | 副 査：鹿児島大学 准教授 安藤 匡子 |
| 題 目 | Study on the Relationship between <i>Legionella pneumophila</i> and Host <i>Paramecium</i> (レジオネラニューモフィラと宿主ゾウリムシとの関係に関する研究) |

審査結果の要旨：

レジオネラニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) はグラム陰性の通性細胞内寄生菌であり、ヒトのレジオネラ症の主な原因菌である。レジオネラ症には、重篤なレジオネラ肺炎と感冒様症状を起こすポンティアック熱の二つの病型が知られている。レジオネラは、自然環境水や土壌に広く生息する環境細菌であり、ヒトへの感染は菌を含んだエアロゾルを吸入することで成立する。また、自然環境中においては、アメーバをはじめとした様々な原生生物の中に存在すると考えられている。原生生物は環境中におけるレジオネラの増殖や生息域の拡大に寄与するものであり、ヒトへの感染リスクを増大させる要因となり得る。しかしながら、自然環境中におけるレジオネラの生態やアメーバ以外の原生生物との関係は十分には解明されていない。そこで、本研究では環境中から分離したレジオネラ株を用いその解析を行った。

1) 環境由来レジオネラ株からのプラスミドの分離とシャトルベクターの構築

環境由来レジオネラ株からのプラスミドの分離とこれを利用したシャトルベクターの作製を行った。レジオネラに限らず多くの細菌の研究には遺伝子工学的な手法が必須であり、そのツールとしてプラスミドが種々のベクターとして使用されている。しかし使用されている多くのベクターは大腸菌由来のプラスミドを起源としており、安定性などに問題がある場合もある。レジオネラ由来のプラスミドはいくつか報告されているが、これらのプラスミドのサイズは数 10 kbp を超えており、ベクターとしては用いられていない。そこで山口県内から分離された環境由来株 5 株についてプラスミドの分離を試みたところ、2 株からプラスミドが分離された。2 つのプラスミドのうち、レジオネラ Ofk308 株 (Ofk308) から分離したプラスミド (pOfk55) についてシーケンス解析を行い、その配列の確認を行った。次に pOfk55 に薬剤耐性遺伝子をレポータ遺伝子として導入し解析を行った結果、レジオネラ内でのプラスミドの複製に必要な

領域が明らかとなった。この領域に大腸菌の *ori*、薬剤耐性遺伝子、*tac* プロモータおよびマルチクローニングサイトをクローニングすることで、シャトルベクター pNT562 を得た。pNT562 の性質を確認したところ、他のレジオネラのベクターと比較して菌への導入効率が高く、我々の保有するすべてのレジオネラ株において複製することが確認された。また抗生物質を加えていない非選択圧下においても、pNT562 はレジオネラ内で長期間維持された。さらに、pNT562 に GFP 遺伝子をクローニングした pNT563 を作製し、レジオネラと大腸菌に導入したところ、安定して GFP の発現が確認された。以上の結果から pOfk55 を利用し作製したベクター pNT562 はレジオネラの遺伝子工学的解析のためのツールとして有用であることが示された。

2) レジオネラとゾウリムシとの関係

環境由来レジオネラ株である Ofk308 とその自然宿主としての *Paramecium tetraurelia* との関係の解明を行った。ゾウリムシ (*Paramecium* spp.) はレジオネラの自然宿主となり得ると考えられているが、詳細は明らかとなっていない。そこで本研究では、レジオネラの病原因子として知られている I 型分泌装置に注目し、レジオネラとゾウリムシとの関係における機能解析を行った。Ofk308 は一部のゾウリムシに対して毒性を示すことが報告されているため、まず、Ofk308 が *P. tetraurelia* に毒性を示すか確認した。その結果、MOI 依存的に毒性を示すことが明らかとなった。次にこの毒性に I 型分泌装置が関与するか検討するため、Ofk308 を親株として I 型分泌装置に関与する遺伝子の欠損株を作製したところ、*tolC* を欠損させた株では毒性が消失した。しかし、I 型分泌装置の他の構成タンパク等を欠損させても毒性は減弱せず、Ofk308 の毒性は I 型分泌装置ではなく *TolC* のみに依存することが示唆された。毒性を示すメカニズムを明らかとするために、ゾウリムシ細胞内の菌数および食胞とリソソームの融合について比較したが大きな違いは認められなかった。そこで、ゾウリムシの消化過程に注目し、食胞形成と菌の排出について比較を行った。その結果、Ofk308 を感染させた場合ではゾウリムシの食胞形成が阻害されたが、*tolC* 欠損株では阻害されなかった。さらに、ゾウリムシからの菌の排出も *TolC* 依存的に阻害されていることが確認された。これらの結果は、レジオネラのゾウリムシに対する毒性に *TolC* が関与し、かつレジオネラがゾウリムシ内に残存するために *TolC* が必要であることを示唆している。レジオネラがゾウリムシの中に残存することにより、生息域を拡大させていると推察される。このような観点からも、原生生物との関係を含めたレジオネラの生態を解明することはレジオネラ症を制御する上で重要である。本研究は環境中のレジオネラに焦点をあて、その解析を試みたものであり、レジオネラの環境中の生態を解き明かすための一助となると考えられる。

以上により、審査委員一同は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。