

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	レジオネラの宿主ファゴソーム内における生存・増殖に必要な鉄の供給を担うエフェクターの新規制御系の解析及びその変異による高病原性化機構の解明				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・講師	氏名	三宅 正紀
	研究分担者	所属・職名	米国レイビル大学医学部・教授	氏名	Yousef Abu Kwaik
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	薬学部・講師	氏名	三宅 正紀

講演題目	レジオネラ <i>ccm</i> 遺伝子によるレジオネラ小胞 (LCV) 内への鉄輸送エフェクターLPW_30711 の発現制御解析
------	--

研究の目的、成果及び今後の展望

我々はこれまでに、レジオネラ症病原体 *Legionella pneumophila* (*Lp*) 野生株 AA100 ゲノムへのトランスポゾン (Tn) 挿入変異により、マクロファージ (Mφ) 内における増殖性が欠損しているにもかかわらず、野生株と同等の高い細胞毒性を示す *Tox^h* (hyper toxic) 株 4 株 (GS147、GO108、GT282、GE193) を分離した。GS147 株の変異遺伝子は *lpw_30711* であり、*Lp* Paris 株において *Lp* の発育因子である鉄の飢餓時における取り込みに関与する遺伝子として同定された *iroT* にあたることが判明した。我々はこれまでに、LPW_30711 が菌体内から IV 型分泌装置を介して感染 Mφ 内へ輸送されるエフェクターであり、レジオネラ小胞 (Legionella-containing vacuole, LCV) 内への鉄輸送に関与することを見出している。一方、他の *Tox^h* 株である GO108 株、GT282 株、GE193 株は、シトクロム *c* 成熟化遺伝子群として知られている *ccm* 遺伝子群内に Tn 挿入部位があった。これらの株が *Tox^h* 株として GS147 株と同様の特徴を示すこと、また *ccm* 遺伝子群が *Lp* 菌体内における鉄代謝に影響を及ぼすことから、*ccm* 遺伝子群と *lpw_30711* 遺伝子には何らかの関連がある可能性を推察した。これまでの実験により、GO108 株、GT282 株における *ccmC*、*ccmF* の変異は、LPW_30711 の発現低下を起こすことがタンパク質レベルで確認され、その結果、LCV 内への鉄輸送も低下することを明らかにした。さらに、外部より過剰な鉄を加えることで LCV 内に鉄を供給しても、これら *ccm* 遺伝子変異株は、GS147 株とは異なり、Mφ 内増殖性が十分に補完されないことが見出され、その原因が菌体内の鉄代謝系が正常に機能しないためと推測された。

今回、GO108 株、GT282 株の Mφ 感染における *lpw_30711* の mRNA 発現量を RT-qPCR により解析したところ、AA100 株より有意に低下していることがわかった。*lpw_30711* のプロモーター領域には Fur (ferric uptake regulation) box が存在し、この部位に Fur が結合してリプレッサーとして働くことが知られている。そのため、同じくプロモーター領域に Fur box が存在する他の鉄代謝関連タンパク質をコードする遺伝子 *feoB* (鉄の菌体内へのトランスポーター)、*frgA* (シデロフォア・レジオバクチン合成酵素)、*lbtA* (レジオバクチンの生合成)、*lbtU* (レジオバクチン受容体) の Mφ 内における mRNA 発現量について解析したところ、GO108 株、GT282 株両株におけるこれら全ての遺伝子について、その低下が見られた。これより、*ccm* 遺伝子の Fur box によって制御されるプロモーター領域への関与が推測された。そこで、Mφ 内での GO108 株、GT282 株における *lpw_30711* のプロモーター活性を測定するために、pGS-lac-02 の *lacZ* 遺伝子に *lpw_30711* のプロモーター領域をインフレーム融合したレポータープラスミド pGS-lac-02::*lpw_30711*prom を構築した。本プラスミドを導入したレジオネラ株をヒト Mφ 様細胞 U937 に 16 時間感染させた後菌体を回収し、β-ガラクトシダーゼの基質 ONPG を加え、吸光度を測定することで β-ガラクトシダーゼ活性を評価した。その結果、AA100 株と比較して、GO108 株と GT282 株では *lpw_30711* のプロモーター活性が著しく低下していた。これより、*ccm* 遺伝子の変異により、*lpw_30711* のプロモーター活性が抑制されることが明らかとなった。

これらのことから、*ccm* 遺伝子群はオペロンを形成することが示唆され、*ccm* 変異株ではシトクロム *c* の成熟化自体が阻害されることで、活性化される Fur が増加し、*lpw_30711* や鉄代謝関連遺伝子の発現が抑制される可能性が推測された。