

## レジオネラの宿主細胞内増殖性に関する研究

三宅正紀

Intracellular Survival and Replication of *Legionella Pneumophila* within Host Cells

Masaki MIYAKE

Laboratory of Microbiology and Immunology, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences,  
52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

(Received June 14, 2008)

*Legionella pneumophila* is a facultative intracellular pathogen which replicates within macrophages and monocytes and finally cause a severe pneumonia known as Legionnaires' disease. An important hallmark of the pathogenesis of this bacterium is their ability to manipulate host cell processes, creating a specified replicative niche within host cells. An *L. pneumophila*-containing phagosome (LCP) is allowed to associate sequentially with smooth vesicles, mitochondria, and the rough endoplasmic reticulum (RER) to form a compartment called a replicative phagosome. LCPs are biologically characterized by delayed acidification and a low tendency to fuse with lysosomes. The establishment of these specialized phagosomes is mediated by the Icm/Dot Type IV secretion system, which is essential for the intracellular growth of *L. pneumophila*. *L. pneumophila* utilizes the Icm/Dot system to inject bacterial effector molecules into the host cell cytosol to survive and replicate in the intracellular compartment through modulation of phagosome biogenesis. This review focuses on our studies on specific aspects of *L. pneumophila* infection to host cells and bacterial factors which regulates its intracellular growth. We found several characteristic phenomena leading to *L. pneumophila* infection, which is dependent on LCP formation: active bacterial protein synthesis in *L. pneumophila* within macrophages, specific exclusion of actin-binding protein p57/Coronin-1 from LCP, and suppression of reactive oxygen species (ROS) production by macrophages upon infection with *L. pneumophila*. Furthermore, we identified a novel bacterial factor, PmiA, which is involved in multiplication within both protozoa and macrophages. Our recent study has begun to reveal that the biological function of PmiA is closely associated with that of the Icm/Dot type IV secretion system.

**Key words**—*Legionella pneumophila*; intracellular growth; *pmiA*; *Legionella pneumophila*-containing phagosome (LCP); p57/Coronin-1; reactive oxygen species (ROS)

## 1. はじめに

*Legionella pneumophila* (*Lp*) は、自然環境中に広く常在するグラム陰性桿菌であり、レジオネラ症の代表的な原因病原体である。*Lp* は、自然環境では自由生活アメーバなどの細菌捕食性原生動物内で増殖し、また、ヒト体内では、単球、マクロファージ内で増殖する細胞内寄生細菌である。宿主細胞内における *Lp* は、異物や一般細菌が取り込まれた際のエンドサイトーシス経路から逸脱し形成された異質な食胞 (Legionella-containing phagosome, LCP) 内で増殖する (Fig. 1).<sup>1)</sup> *Lp* を取り囲む食胞

は、そのまわりに滑面小胞体由来の小胞が集合し、融合することによって、食胞膜が小胞体膜と極めて性状が類似した膜に変換される。<sup>2)</sup> その後、ミトコンドリアが接近し、さらにリボソームが膜上に付着し、特殊な形態と化したファゴソーム内で菌は増殖する。最終的に菌は、食胞膜、さらに細胞膜を破ることで細胞外へと脱出し、新たな宿主細胞への感染を繰り返すことで、病態形成に導く。<sup>3)</sup> このような *Lp* 感染における特異的な細胞小器官のリクルートメントは、菌の細胞内増殖を可能、あるいは有利にするために起こる現象であると考えられるが、生化学的な意義、あるいは分子論的にどのような機序に基づいて起こるのかについてはいまだ不明な部分が多い。現在明らかなことの1つとして、これらの現象には、*Lp* が保持するIV型分泌装置 Icm (intracellular multiplication)/Dot (deficient of organelle

静岡県立大学薬学部免疫微生物学分野 (〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)

e-mail: miyakem@ys7.u-shizuoka-ken.ac.jp

\*本総説は、平成19年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

trafficking)<sup>4-6)</sup>により宿主細胞内へ送達されるエフェクターが深く関与し、これらの分子がLCP形成に導くファゴソームのリモデリングなど感染特異的なシグナル伝達を誘導する中心的役割を果たすと考えられている。<sup>7,8)</sup> 現在 *Lp* エフェクターとして、低分子量GTP結合タンパク質のGuanine nucleotide exchange factor (RalF, DrrA),<sup>9,10)</sup> アポトーシス阻害因子 (SdhA),<sup>11)</sup> リソソームタンパク質のトラフィッキング阻害因子 (VipA, VipD)<sup>12)</sup> として機能するものなど、30以上のタンパク質が同定されている。<sup>7)</sup> 最近では、*in silico* 予測を利用したエフェクタースクリーニングから、*Lp* ではトータルで100種前後のエフェクターが存在すると推測される報告もなされている。<sup>13)</sup> 菌の感染から病態形成に至るあらゆるステップに、エフェクターが関与すると推測されるが、現時点で同定されているエフェクターの性状からも、殊にLCPの形成に係わるものが多いと考えられる。<sup>7,9,10,12,14-20)</sup> 近年、Icm/Dot分泌装置の基質として同定される菌体タンパク質が増加し、それら個々のエフェクターとしての機能も徐々に明らかになってきているが、<sup>7,8,21-25)</sup> 感染系におけるLCPの統括的な形成機構、特異的な細胞内トラフィッキングの経時的変化に伴うLCPの性状変化、LCP依存的に起こる特異的な感染現象には、まだまだ未知な部分が多い。また、*Lp* の細胞内増殖性に関しては、エフェクターが介在するLCP形成に依存するのみならず、別な要因を持って影響を与えると推測される菌体因子もこれまでに同定されており、<sup>26-29)</sup> そのような因子のさらなる存在も推測される。本稿では、これまでに筆者らが明らかにしてきた *Lp* の細胞内増殖性を規定するLCP依存的な特異的な感染現象、及び新たに同定した宿主細胞内増殖制御菌体因子とその機能について述べる。

## 2. *Lp* の宿主細胞内動態を規定する菌含有ファゴソームの性状に関する研究

*Lp* 病原株感染時に形成される菌含有ファゴソーム (LCP) は、前述のように、その周囲に細胞内小器官の集合が観察される一方、Icm/Dot変異株などの細胞内増殖性欠損株を感染させた場合では、そのような所見は観察されないことが知られている。したがって、病原株感染と細胞内増殖性欠損株感染では、異なった性状を持つ菌含有ファゴソームが形成され、宿主側からのストレス刺激に対して、フ

ァゴソーム内の菌は異なった応答をすることが予測された。筆者らは、野性株 JR32 と DotA 変異により細胞内増殖性が欠損した LELA3118 株をヒトマクロファージ様細胞 U937 へ感染させ、細胞内で発現する菌のタンパク質合成を <sup>35</sup>S パルスラベル法にて解析したところ、JR32 株においては、DnaK や Hsp60 のストレスタンパク質を含む数多くのタンパク質の発現がみられたが、LELA3118 株の場合、それらタンパク質の発現が著しく阻害されていた [Fig. 2(A)] (*in vitro* 培養において両菌株は遜色ない増殖性、ストレス応答性を示すことを確認している)。<sup>30)</sup> この LELA3118 株の宿主内における菌体タンパク質の合成阻害現象が、ストレスタンパク質のみに限られたことか、それとも全菌体タンパク質に対して起こることなのかを明らかとするために、

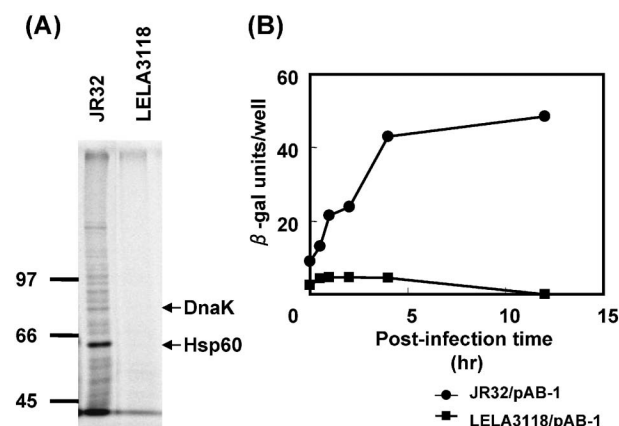


Fig. 2. Cessation of Protein Synthesis for Intracellular Growth-deficient *L. pneumophila dotA* Mutant within Macrophages

(A) Intracellular protein expression of *L. pneumophila* strains within U937 macrophage-like cells. The U937 cells were infected with *L. pneumophila* JR32 (wild type), LELA3118 (*dotA* mutant). At 12 h post-infection, Tran<sup>35</sup>S label was added and the proteins were metabolically labeled for 2 h. Radiolabeled bacterial proteins were analyzed by SDS-PAGE. Lane 1: JR32, lane 2: LELA3118. (B) Induction of  $\beta$ -galactosidase in intracellular *L. pneumophila* with pAB-1. U937 cells were infected with *L. pneumophila* with pAB-1. At several time points post-infection,  $\beta$ -galactosidase activity in the cell lysate was determined.



三宅正紀

静岡県立大学薬学部講師。東京薬科大学薬学部卒業。東京薬科大学大学院薬学研究科修士課程・岐阜大学大学院医学研究科博士課程修了。1997年静岡県立大学薬学部助手。2000年より現職。この間、国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）協力研究員、ケンタッキー大学客員研究員（Yousef Abu Kwaik 教授）、コロンビア大学博士研究員（Howard A. Shuman 教授）。

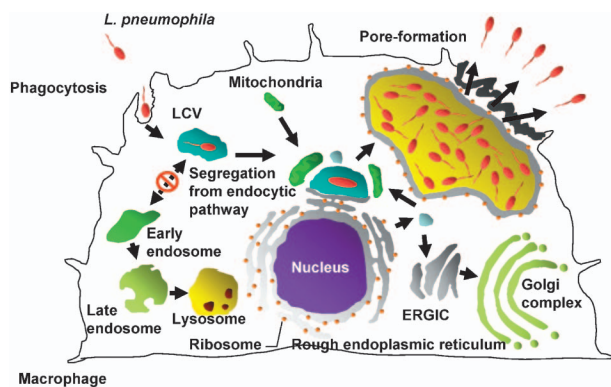


Fig. 1. Intracellular Trafficking of *Legionella pneumophila* within Phagocytic Cells.

ERGIC: endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment.

*tac* プロモーター制御下 IPTG で発現誘導可能な *lacZ* をコードするプラスミド pAB-1 を導入した *Lp* 株を構築し、マクロファージ感染系で宿主内における *lacZ* 発現を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性として検出するレポーターアッセイを行った。その結果、JR32 株は感染直後から経時的な  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の増加が観察された一方、LELA3118 株は感染後少なくとも 12 時間後まで一貫してほとんどその活性がみられなかった [Fig. 2 (B)].<sup>30</sup> よって、マクロファージ内において LELA3118 株は、ストレス応答のみでなく、全菌体タンパク質合成の阻害を強いられ、細胞内増殖性の欠損に至ることが分かった。これら JR32 株及び LELA3118 株の宿主細胞内における応答性の違いは、各々の感染において形成されるファゴソーム性状の違い、特に JR32 株感染時において宿主殺菌攻撃に対して抵抗性を付与する LCP の特異的性状に基づくものと推察される。しかしながら、JR32 株の感染系でも、自由生活アメーバ *Acanthamoeba polyphaga* 内で誘導される菌のタンパク質合成は、U937 細胞内に比して低下する。<sup>30</sup> これは、*Lp* にとって、自然環境中での増殖の場であり、ストレス刺激の少ないアメーバ内と、偶発的に入り込み、宿主の感染防御免疫による殺菌攻撃を受けるマクロファージ内では、*Lp* の宿主としての意味合いが異なることを反映した現象と考えられる。

筆者らは、LCP のさらなる特性を見出すために、p57/coronin-1 に着目した。p57/coronin-1 は、コロニンファミリーに属するアクチン結合タンパク

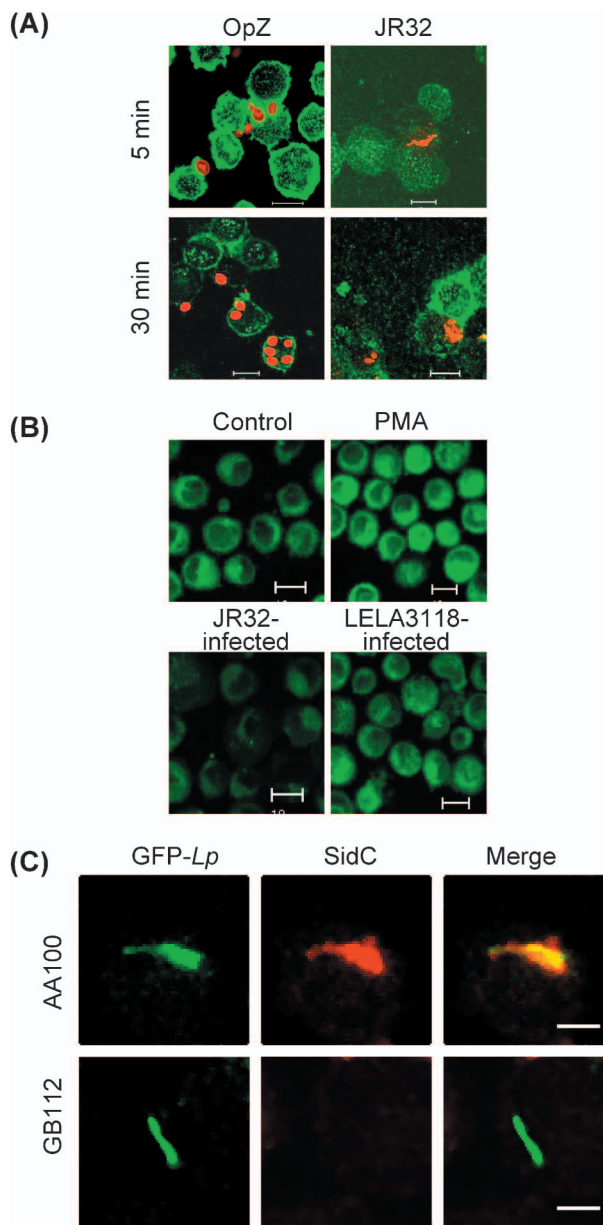


Fig. 3. Representative Confocal Microscopic Images.

(A) Localization of p57/coronin-1 with phagosomes containing *L. pneumophila* strains or Texas-Red opsonized zymosan (TROpZ) within U937 cells. U937 cells were infected with *L. pneumophila* JR32 or LELA3118 strain. The cells were incubated for 5 or 30 min. After permeabilization, p57/coronin-1 was visualized with mouse anti-p57/coronin-1 monoclonal antibodies and secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 (green). Intracellular *L. pneumophila* (red) were visualized by staining with rabbit anti-*L. pneumophila* polyclonal antibodies and secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 546. The images obtained at the indicated time periods are shown. Bars represent 10  $\mu$ m. (B) hROS production within U937 cells after infection with *L. pneumophila* strains. Following bacteria infection, cells were incubated for 15 min in PBS containing 20  $\mu$ M APF. hROS was revealed by fluorescence of the APF product in living cells. As a positive control, cells were stimulated with PMA (100 ng/ml). Bars represent 10  $\mu$ m. (C) Extracellular secretion of *L. pneumophila* effector SidC within U937 cells. *L. pneumophila* strains carrying GFP-plasmid were used for infection. The infection of *L. pneumophila* AA100 (wild type), GB112 (*pmiA* deficient) to U937 cells was continued for 1 h. Extracellular *L. pneumophila* were labeled with rabbit anti-*L. pneumophila* polyclonal antibodies and secondary antibodies conjugated to Alexa546. Intracellular *L. pneumophila* were visualized with only GFP (green). After permeabilization, SidC proteins was visualized with rabbit anti-SidC serum and secondary antibody conjugated with Alexa633 (red). Bars represent 5  $\mu$ m.

質であり、哺乳動物の免疫細胞において特異的に発現していることが知られている。<sup>31)</sup> 細胞性粘菌のコロニンでは、細胞の貪食、走化性、細胞分裂などの細胞運動に関与しているとの報告がなされていることから、p57/coronin-1においても、同様な機能を保持していることが推測される。<sup>32,33)</sup> 特に、p57/coronin-1のマウスホモログであるTACO (Tryptophane aspartate-containing coat protein) は、牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG 生菌感染マクロファージにおいて、菌を含むファゴソームへ持続的に集積するのに対して、加熱死菌貪食時では、一過的な集積ののち、解離することが以前より報告されていたが、<sup>34)</sup> のちに、生菌が分泌する lipoamide dehydrogenase C (LpdC) がファゴソーム膜上でTACOと結合とすることにより、TACOの持続的な集積を可能としていることが示された。<sup>35)</sup> このことから、マクロファージ内の結核菌は自身を含むファゴソームへTACOを持続的に集積させることで、ファゴソームの成熟を阻害している可能性が推測されている。また、p57/coronin-1に関しては、HL-60細胞の異物貪食の際、異物含有ファゴソームへ一過的に集積することが示されており、これはプロテインキナーゼCによるリン酸化によって促され、そのリン酸化の阻害は、ファゴソームからのp57/coronin-1及びアクチンの解離、及びLAMP-1 (lysosomal associated membrane glycoprotein-1) のファゴソームへの集積を阻害することが明らかにされている。<sup>36)</sup> これは、p57/coronin-1のファゴソーム成熟へのなんらかの役割、影響を裏付けるものであった。これらの事実を根拠に、筆者らは、*Lp* のマクロファージ感染におけるp57/coronin-1の挙動を調べた。U937細胞へJR32株及びLELA3118株を感染させたとき、菌の細胞への接着部位においては、アクチンとともにp57の集積がみられた。<sup>37)</sup> しかしながら、菌取り込み後のファゴソームへのp57リクルートメントについて、陽性対象であるオプソニン化ザイモサンや*Lp* 加熱死菌の貪食の場合は、30分以内にファゴソームへ一過的な集積がみられるのに対して、JR32株及びLELA3118株の場合は、感染後一貫してほとんどその集積が確認できなかった [Fig. 3(A)]. また、臨床分離例がなく、細胞内増殖性を示さない *Legionella gratiana* を感染させた場合も同様な挙動を示した。<sup>37)</sup> これまで、初期

LCPには、Rab5, transferrin receptor, LAMP-1, cathepsin D といったエンドソーム・リソソームマーカーの集積がみられず、LCPが通常のファゴソーム成熟経路を逸脱した経路で形成されると考えられている。<sup>1,38)</sup> 筆者らが観察したレジオネラ属菌生菌感染時に特異的にみられる菌含有ファゴソームからのp57/coronin-1の排除は、これを反映した現象と推測される。しかしながら、LELA3118株及び*L. gratiana* 感染の場合でも、本現象が起こることは、これが、IV型分泌装置に非依存的で、かつ、一部あるいはすべてのレジオネラ属菌種感染時に特有な現象である可能性を示す。したがって、病原種である*Lp* がマクロファージ内増殖を可能にするファゴソームLCPを形成するには、*Lp* 特異的菌体因子が誘発するadditionalなファゴソームのリモデリング機構が存在すると考えられる。

### 3. *Lp* のマクロファージ感染における活性酸素種による殺菌作用からの回避に関する研究

細胞内寄生菌である*Lp* は、酸素非依存的な殺菌攻撃に対しては、前述のように、通常とは逸脱したファゴソーム形成経路を辿ることでLCPを形成し、リソソームとの融合を阻害することで回避する。一方で、宿主が産生する活性酸素種による酸素依存的な殺菌攻撃に対して、*Lp* はどのような対応をするのかについては、これまで明らかではなかった。筆者らは、*Lp* のマクロファージ感染系において、培養上清にリークしてくるスーパーオキシドアニオン (SOA) を測定したところ、LELA3118株感染時では、未感染時より、その産生量が増加したが、JR32株感染時では、逆に抑制されることを見出した。<sup>39)</sup> また、活性酸素種検出用蛍光試薬APF (アミノフェニルフルオレセイン) を使用して、活性酸素種の産生性を蛍光シグナルとして検出し、この現象を個々の感染細胞レベルで視覚的に確認することに成功した [Fig. 3(B)]. 細胞における活性酸素は、NADPH オキシダーゼの触媒により産生される。NADPH オキシダーゼは、膜在性の flavocytochrome *b*<sub>558</sub> が酵素本体であるが、その活性化には、細胞質性の活性化タンパク質 p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, 及び低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac の結合が必須である。<sup>40)</sup> そこで、細胞質性活性化タンパク質の1つである p47<sup>phox</sup> に関する *Lp* 含有ファゴソームへの集積性について調べたところ、

JR32 株含有ファゴソームでは、感染 5 分後において、既にその集積性が低下していることが分かった。<sup>39)</sup> これらの結果から、*Lp* 野性株感染細胞における活性酸素産生抑制現象は、菌含有ファゴソームへの *p47<sup>phox</sup>* のリクルートメントの低下による NADPH オキシダーゼ活性の低下が原因の 1 つとなっていることが明らかとなった。*Lp* は感染直後からエフェクターを宿主内へ注入し、その特異的シグナル伝達を促すことが明らかとなっており、<sup>41)</sup> 同時に LCP 形成も開始されると考えられる。特に菌が宿主細胞膜上に接触し、侵入を開始する時点は、LCP 形成に導くシグナル伝達の起点となることが推測される。また、マクロファージによる異物貪食には、イノシトールリン脂質がそのシグナル伝達物質として重要な役割をしていることが知られており、そのリン酸化を触媒するクラス I PI3-K の阻害剤であるワートマンニン処理により、貪食が阻害される。<sup>42)</sup> しかしながら、マクロファージによる *Lp* 病原株の貪食は、ワートマンニン処理によっても阻害されないことが明らかにされている。<sup>43)</sup> この事実は、マクロファージによる *Lp* 病原株の取り込みは、菌によって通常の異物貪食経路が改変されている、あるいは、菌が能動的にマクロファージ内へ侵入していることを示している。これらのことを考え併せると、LCP 形成に導く特異的シグナル伝達には、LCP 内の活性酸素の産生抑制に導くべくシグナル誘導も含まれ、感染時にその機能を担う未知のエフェクターを注入しながら、能動的に宿主内へ侵入する可能性が考えられる。これに関しては、今後さらなる解析が必要である。

#### 4. *Lp* 宿主細胞内増殖制御菌体因子 PmiA の同定と機能解析に関する研究

筆者らは、ランダムトランスポゾン変異導入によるスクリーニングで得た *Lp* マクロファージ及び原生動物感染性変異株ライブラリー<sup>44)</sup> の中で、GB112 株について変異遺伝子部位同定を含む性状解析を行った。GB112 株は、野性株 AA100 と比較して、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* 及び U937 細胞両宿主内において顕著な増殖性の低下を示した [Fig. 4(A)]. GB112 株の変異遺伝子部位を解析したところ、915bp の open reading frame (*lpg1728*) 内にトランスポゾンが挿入され、この変異が当該菌株に著しい細胞内増殖性の低下を付与す

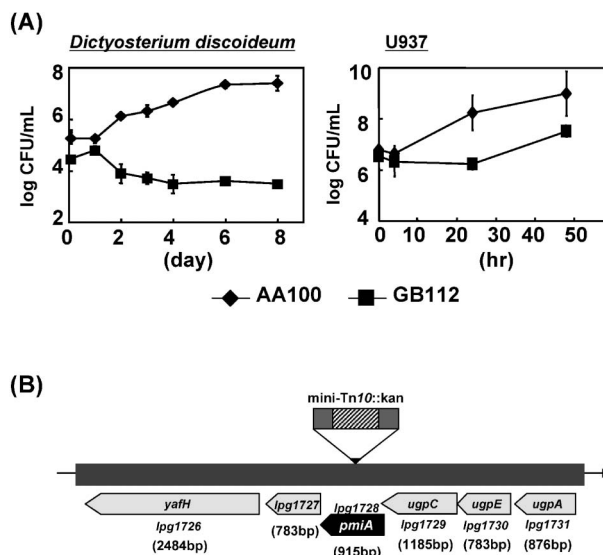


Fig. 4. Genetic and Biological Analysis of *L. pneumophila pmiA* Mutant Strain GB112.

(A) Intracellular growth kinetics of AA100 and GB112 strains within *Dictyostelium discoideum* and U937 cells. The intracellular bacteria were recovered at several times post-infection, and the number of viable bacteria was determined by enumeration of CFU on BCYE plates. (B) Genetic organization of the mutated region in the GB112 strain. *Mini-Tn10::kan* was inserted into a putative open reading frame *lpg1728* (*pmiA*).

ることが分かった。筆者らは、本遺伝子が機能未知遺伝子であったことから、これを *pmiA* (protozoan and macrophage infectivity A) と命名した [Fig. 4(B)].<sup>45)</sup> *pmiA* 遺伝子産物 (PmiA) に関して、そのアミノ酸配列を SOSUI プログラムを使用して菌体内局在を予測したところ、3 回膜貫通型タンパク質であると推測された。実際に、PmiA を M45 タグとの融合タンパク質として *Lp* 菌体内で発現させ、菌体タンパク質のそれぞれの細胞画分に対して、M45 抗体によるウェスタンブロッティングを行ったところ、菌体膜画分にバンドが検出され、PmiA が膜タンパク質であることが判明した。PmiA の機能を明らかにするために、PmiA と同様に菌体膜に局在し、細胞内増殖性に関与する IV 型分泌装置 Icm/Dot に着目し、Icm/Dot 依存的に行われることが知られている *Lp* 機能に関して、*pmiA* 変異が及ぼす影響について調べた。*pmiA* 変異株の宿主細胞内における増殖性低下の一原因として考えられた菌含有ファゴソームのリソソームとの融合について、<sup>1,46)</sup> 後期エンドソーム・リソソームマーカー LAMP-1/2 と菌含有ファゴソームとの共局在の割合を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で調べたところ、感染 4 時間後の時点で、*pmiA* 変異株では野性株の場

合と比べて明らかに高率を示した。また、真核細胞膜に対する孔形成能に関して、<sup>47)</sup> 赤血球の菌体との接触時の溶血活性を指標として調べたところ、*pmiA* 変異株では低下していることが分かった。さらに、*Lp* エフェクターの1つである SidC の感染マクロファージ内における菌体外分泌<sup>16)</sup> を SidC 抗体を用いて調べたところ、AA100 株含有ファゴソームでは菌体周囲から滲みだすような SidC の蛍光シグナルが観察されたが、*pmiA* 変異株含有ファゴソームではそのような所見がほとんどみられなかった [Fig. 3(C)]。このように、筆者らがこれまでに調べたこれら *pmiA* 変異株の感染性状は、IV型分泌装置のコンポーネントである Icm/Dot 変異株でこれまで報告されている性状と同様であった。これらのことから、PmiA は膜タンパク質として同じく菌体膜上で機能する Icm/Dot IV型分泌装置となんらかの関連を持つことが示され、現在筆者らは、その可能性の1つとして、PmiA が Icm/Dot 分泌装置の一部を形成するあるいは co-factor として機能していることを推測している。Icm/Dot 分泌装置をコードする 23 の遺伝子群は、ゲノム上の2つの領域に分かれ、病原遺伝子塊 (pathogenicity island) を形成しているが、<sup>48)</sup> *pmiA* 遺伝子はこれら2領域からともに 1 M bp 以上離れる位置に局在しており、ゲノム上の位置から相互の機能的関連を見出すことはできなかった。また、Icm/Dot 分泌装置に協調して働く他の菌体因子はこれまでに報告がないことから、筆者らが得た上記知見は興味深く、現在も解析を継続している。

## 5. おわりに

*Lp* は、自然環境及び生体内環境双方において宿主内に寄生する細胞内寄生細菌として生存・増殖できる一方、自然環境中では、環境条件によって planktonic cell 状態、<sup>1)</sup> バイオフィーム形成状態、<sup>1)</sup> あるいは VBNC (viable but nonculturable) 状態<sup>49)</sup> など、あらゆる生存形態を取る。また、*Lp* のヒトへの感染における病態形成は、菌が accidental に暴露された一環境において、生物として生存する本能を遂行した結果として考えることができる。これらのことは、*Lp* が様々な環境を敏感に察知し、それぞれに対応して自身が生存できるような種々の制御系を持つことを示している。特に、宿主感染系における *Lp* の生存機構及び病原性発現機構は、宿主因

子との相互作用が深く関与し、複雑化しているものと考えられる。2004年に *Lp Philadelphia* 株、Paris 株及び Lens 株のゲノム配列が相次いで発表され、<sup>50,51)</sup> 今やレジオネラに関するポストゲノム研究が盛んになってきた。さらに、トランスクリプトーム・プロテオームなどの機能ゲノム解析は、*Lp* の多彩な生存形態を制御する仕組みをゲノムワイドな視点で捉え、様々な環境において応答する個々の因子の機能も、他因子との相関関係及び相互作用解析から効率よく追究できる。今後、多彩な生存形態を持つ *Lp* の生命現象のしくみが包括的に明らかにされていくと同時に、生物学における新たな規範の提唱へつながる事象が見い出されることを期待する。

**謝辞** 本研究は静岡県立大学薬学部免疫微生物学分野で行ったものであり、終始貴重なご意見、ご助言を賜りました今井康之教授、また、実験に携わった大学院生及び学部生諸氏に深甚なる謝意を表します。また、共同研究者として多大なご協力を頂きました米国レイビル大学 Yousef Abu Kwaik 教授、貴重な実験材料をご提供頂きました東京大学薬学部長野哲雄教授、星薬科大学辻勉教授・伊藤佐生智博士、及び適切なご助言を賜りました米国コロンビア大学 Howard A. Shuman 教授に心から感謝いたします。

## REFERENCES

- 1) Swanson M. S., Hammer B. K., *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 567–613 (2000).
- 2) Tilney L. G., Harb O. S., Connelly P. S., Robinson C. G., Roy C. R., *J. Cell Sci.*, **114**, 4637–4650 (2001).
- 3) Kwaik Y. A., *Mol. Microbiol.*, **30**, 689–695 (1998).
- 4) Brand B. C., Sadosky A. B., Shuman H. A., *Mol. Microbiol.*, **14**, 797–808 (1994).
- 5) Vogel J. P., Andrews H. L., Wong S. K., Isberg R. R., *Science*, **279**, 873–876 (1998).
- 6) Segal G., Feldman M., Zusman T., *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 65–81 (2005).
- 7) Ninio S., Roy C. R., *Trends Microbiol.*, **15**, 372–380 (2007).
- 8) Shin S., Roy C. R., *Cell. Microbiol.*, **10**, 1209–1220 (2008).



- 9) Nagai H., Kagan J. C., Zhu X., Kahn R. A., Roy C. R., *Science*, **295**, 679–682 (2002).
- 10) Murata T., Delprato A., Ingmundson A., Toomre D. K., Lambright D. G., Roy C. R., *Nat. Cell. Biol.*, **8**, 971–977 (2006).
- 11) Laguna R. K., Creasey E. A., Li Z., Valtz N., Isberg R. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 18745–18750 (2006).
- 12) Shohdy N., Efe J. A., Emr S. D., Shuman H. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 4866–4871 (2005).
- 13) Kubori T., Hyakutake A., Nagai H., *Mol. Microbiol.*, **67**, 1307–1319 (2008).
- 14) Campodonico E. M., Chesnel L., Roy C. R., *Mol. Microbiol.*, **56**, 918–933 (2005).
- 15) Conover G. M., Derre I., Vogel J. P., Isberg R. R., *Mol. Microbiol.*, **48**, 305–321 (2003).
- 16) Luo Z. Q., Isberg R. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 841–846 (2004).
- 17) VanRheenen S. M., Luo Z. Q., O'Connor T., Isberg R. R., *Infect. Immun.*, **74**, 3597–3606 (2006).
- 18) Liu Y., Luo Z. Q., *Infect. Immun.*, **75**, 592–603 (2007).
- 19) Derre I., Isberg R. R., *Infect. Immun.*, **73**, 4370–4380 (2005).
- 20) Bardill J. P., Miller J. L., Vogel J. P., *Mol. Microbiol.*, **56**, 90–103 (2005).
- 21) Chen J., de Felipe K. S., Clarke M., Lu H., Anderson O. R., Segal G., Shuman H. A., *Science*, **303**, 1358–1361 (2004).
- 22) de Felipe K. S., Pampou S., Jovanovic O. S., Pericone C. D., Ye S. F., Kalachikov S., Shuman H. A., *J. Bacteriol.*, **187**, 7716–7726 (2005).
- 23) Machner M. P., Isberg R. R., *Dev. Cell*, **11**, 47–56 (2006).
- 24) Chen J., Reyes M., Clarke M., Shuman H. A., *Cell. Microbiol.*, **9**, 1660–1671 (2007).
- 25) Ingmundson A., Delprato A., Lambright D. G., Roy C. R., *Nature*, **450**, 365–369 (2007).
- 26) Harb O. S., Abu Kwaik Y., *Infect. Immun.*, **66**, 1898–1903 (1998).
- 27) Hales L. M., Shuman H. A., *J. Bacteriol.*, **181**, 4879–4889 (1999).
- 28) Harb O. S., Abu Kwaik Y., *Infect. Immun.*, **68**, 6970–6978 (2000).
- 29) Kohler R., Fanghanel J., Konig B., Luneberg E., Frosch M., Rahfeld J. U., Hilgenfeld R., Fischer G., Hacker J., Steinert M., *Infect. Immun.*, **71**, 4389–4397 (2003).
- 30) Miyake M., Fukui T., Imai Y., *Microb. Pathog.*, **40**, 161–170 (2006).
- 31) Suzuki K., Nishihata J., Arai Y., Honma N., Yamamoto K., Irimura T., Toyoshima S., *FEBS Lett.*, **364**, 283–288 (1995).
- 32) Maniak M., Rauchenberger R., Albrecht R., Murphy J., Gerisch G., *Cell*, **83**, 915–924 (1995).
- 33) de Hostos E. L., *Trends Cell Biol.*, **9**, 345–350 (1999).
- 34) Ferrari G., Langen H., Naito M., Pieters J., *Cell*, **97**, 435–447 (1999).
- 35) Deghmane A. E., Soualhine H., Bach H., Sendide K., Itoh S., Tam A., Noubir S., Talal A., Lo R., Toyoshima S., Av-Gay Y., Hmama Z., *J. Cell Sci.*, **120**, 2796–2806 (2007).
- 36) Itoh S., Suzuki K., Nishihata J., Iwasa M., Oku T., Nakajin S., Nauseef W. M., Toyoshima S., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 837–844 (2002).
- 37) Hayashi T., Miyake M., Fukui T., Sugaya N., Daimon T., Itoh S., Oku T., Tsuji T., Toyoshima S., Imai Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 861–865 (2008).
- 38) Clemens D. L., Lee B. Y., Horwitz M. A., *Infect. Immun.*, **68**, 2671–2684 (2000).
- 39) Harada T., Miyake M., Imai Y., *Microbiol. Immunol.*, **51**, 1161–1170 (2007).
- 40) Lambeth J. D., *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 181–189 (2004).
- 41) Nagai H., Cambronne E. D., Kagan J. C., Amor J. C., Kahn R. A., Roy C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 826–831 (2005).
- 42) Araki N., Johnson M. T., Swanson J. A., *J. Cell Biol.*, **135**, 1249–1260 (1996).
- 43) Khelef N., Shuman H. A., Maxfield F. R., *Infect. Immun.*, **69**, 5157–5161 (2001).
- 44) Gao L. Y., Stone B. J., Brieland J. K., Abu Kwaik Y., *Microb. Pathog.*, **25**, 291–306 (1998).
- 45) Miyake M., Watanabe T., Koike H., Molmeret M., Imai Y., Abu Kwaik Y., *Infect. Immun.*, **73**, 6272–6282 (2005).
- 46) Wiater L., Dunn A. K., Maxfield F. R., Shuman H. A., *Infect. Immun.*, **66**, 4450–4460 (1998).
- 47) Kirby J. E., Vogel J. P., Andrews H. L., Is-

- berg R. R., *Mol. Microbiol.*, **27**, 323–336 (1998).
- 48) Segal G., Shuman H. A., *Trends Microbiol.*, **6**, 253–255 (1998).
- 49) Steinert M., Emody L., Amann R., Hacker J., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2047–2053 (1997).
- 50) Chien M., Morozova I., Shi S., Sheng H., Chen J., Gomez S. M., Asamani G., Hill K., Nuara J., Feder M., Rineer J., Greenberg J. J., Steshenko V., Park S. H., Zhao B., Teplit-skaya E., Edwards J. R., Pampou S., Georghiou A., Chou I. C., Iannuccilli W., Ulz M. E., Kim D. H., Geringer-Sameth A., Goldsberry C., Morozov P., Fischer S. G., Segal G., Qu X., Rzhetsky A., Zhang P., Cayanis E., De Jong P. J., Ju J., Kalachikov S., Shuman H. A., Russo J. J., *Science*, **305**, 1966–1968 (2004).
- 51) Cazalet C., Rusniok C., Bruggemann H., Zidane N., Magnier A., Ma L., Tichit M., Jarraud S., Bouchier C., Vandenesch F., Kunst F., Etienne J., Glaser P., Buchrieser C., *Nat. Genet.*, **36**, 1165–1173 (2004).