

令和元年5月26日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15274

研究課題名(和文) 熱帯性コオロギ感染モデルを用いた細菌の温度依存性病原性発動メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of temperature-dependent bacterial virulence using cricket infection model

研究代表者

垣内 力 (KAITO, Chikara)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60420238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：無脊椎動物を用いた細菌感染モデルは多数の個体数を扱うことが可能であるため、感染プロセスに関わる生体分子を探索する上で優れている。しかしながら、これまで無脊椎動物の感染モデルとして利用されてきた、カイコ、線虫、ショウジョウバエは、ヒトの体温である37度において長時間生存することができず、ヒトの感染症がおきる温度での病原性細菌の感染プロセスを明らかにするためには適当でない。本研究で我々は、熱帯性昆虫であるフタホシコオロギが37度におけるヒト病原体の感染モデルとして利用出来ることを見出した。さらに、本モデルを用いて、ヒト病原体による温度依存性の動物殺傷能に関わる遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、フタホシコオロギを用いて、温度依存性の細菌の動物殺傷メカニズムの解明を可能とする動物感染モデルを確立した。本モデルを用いて、常温と37度における感染プロセスを比較解析することにより、ヒト病原体の温度依存性の病原性メカニズムに関わる生体分子群を同定できる点で学術的意義がある。また、本モデルは温度依存性の細菌の病原性システムを標的とする薬剤の評価を可能とする点で、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Invertebrate animal infection models are suitable for screening biological molecules involved in infectious processes, because many times of infection experiments are possible. However, frequently-used invertebrate models such as silkworms, fruit flies, and nematodes cannot survive for a long time at 37 degree, and are not suitable for evaluating infectious processes at 37 degree, which is a human body temperature. In this study, we revealed that two-spotted cricket, a tropical insect, can be used as an infection animal model of human pathogen at 37 degree. Furthermore, we identified a gene involved in temperature-dependent killing activity of bacteria against animals by using the cricket infection model.

研究分野：微生物学、生化学、分子生物学

キーワード：フタホシコオロギ 温度依存性 ヒト病原体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌の病原性発現制御機構の理解の重要性

細菌が病原性発現のスイッチをオンにする機構の理解は、細菌の病原性の理解のみならず、細菌感染症の治療方策を確立する上で重要である。環境中の細菌は、温度の上昇をヒト体内に侵入した情報として利用していると考えられているが、温度依存の細菌の病原性上昇機構はほとんど明らかになっていない。その機構の理解には、動物モデルを用いて、異なる温度における細菌の病原性の違いを捉える必要がある。

(2) 従来の感染モデル動物の問題点

ほ乳動物のモデルは恒温動物であるため、温度条件を変えた際の感染現象の変化を検討することはできない。さらに、線虫やショウジョウバエなどの無脊椎動物のモデル動物は、37度の温度条件での生存が難しく、高温での感染実験ができない。代表者は昆虫であるカイコを利用した感染モデルを構築し、宿主-病原体相互作用に関わる細菌因子群の同定、ならびに、新しい自然免疫機構の解明に成功している。しかしながら、カイコモ37度に感受性であるため、37度における細菌の病原性評価には不適である。ハチノスツヅリガの幼虫を37度で感染実験に使用する研究が行われているが、高温で細菌感受性が高まる上に、入手が困難という問題点がある。

(3) フタホシコオロギの感染モデル動物としての利点

フタホシコオロギは熱帯に生息する昆虫であり、37度においても、飼育する事が可能である。したがって、低温と高温の両者において、感染実験を行うことが可能である。フタホシコオロギは、動物の餌として世界中で養殖されているため、常時、実験に必要な多数の個体を購入することができる。また、フタホシコオロギの体サイズは大きく、サンプルの定量的注射が容易である。

2. 研究の目的

ヒトに感染する病原性細菌は環境温度の変化を病原性発現のシグナルとして利用していると考えられているが、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。これまで感染モデル動物として用いられてきたマウスなどの脊椎動物は恒温動物であるため、温度を変化させて感染実験を行うことが困難である。また、変温動物である、カイコ、線虫、ショウジョウバエなどのモデル動物は37度に感受性であるため、ヒト病原性細菌の病原性が最も上昇すると考えられる37度において感染実験を行うことができない。本研究では、熱帯性昆虫であるフタホシコオロギを用いて、37度におけるヒト病原性細菌の病原性の定量的評価を可能とする感染モデルを確立し、温度変化に依存した細菌の病原性制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

- (1) ヒト病原体（細菌と真菌）のフタホシコオロギに対する病原性の検討
- (2) ヒト病原体によるフタホシコオロギの感染死に対する温度の影響の検討
- (3) フタホシコオロギ感染モデルを用いた、温度依存性の細菌の病原性制御機構の解明

4. 研究成果

(1) フタホシコオロギを用いたヒト病原性細菌の感染モデルの確立

黄色ブドウ球菌、リステリア、または緑膿菌を体液中に注射されたコオロギは、24時間以内に死亡した（図1）。コオロギの黄色ブドウ球菌または緑膿菌に対する感受性は、37度と27度の間で変化しなかった。一方、リステリアに対するコオロギの感受性は、27度と比べて37度において上昇した。さらに、黄色ブドウ球菌の病原性に必要な *cvfA*、*agr*、*srtA* 遺伝子の欠損株は、親株と比較してコオロギに対する殺傷活性が低下していた。以上の結果は、フタホシコオロギが37度と27度のふたつの温度条件においてヒト病原性細菌の感染モデル動物として利用可能であり、細菌の病原性遺伝子の評価に有効であることを示唆している。また、黄色ブドウ球菌と緑膿菌のコオロギに対する殺傷活性は温度依存性を示さない一方で、リステリアのコオロギに対する殺傷活性は温度依存に上昇することが明らかとなった。



図1. 緑膿菌と黄色ブドウ球菌によるフタホシコオロギの感染死

病原性に必要な *cvfA*、*agr*、*srtA* 遺伝子の欠損株は、親株と比較してコオロギに対する殺傷活性が低下していた。以上の結果は、フタホシコオロギが37度と27度のふたつの温度条件においてヒト病原性細菌の感染モデル動物として利用可能であり、細菌の病原性遺伝子の評価に有効であることを示唆している。また、黄色ブドウ球菌と緑膿菌のコオロギに対する殺傷活性は温度依存性を示さない一方で、リステリアのコオロギに対する殺傷活性は温度依存に上昇することが明らかとなった。

(2) フタホシコオロギを用いたヒト病原性真菌の感染モデルの確立

フタホシコオロギの体液中にヒトの病原性真菌であるカンジダ・アルビカンス、カンジダ・グラブラータ、クリプトコックス・ネオフォルマンスを注射したところ、27度と37度のいずれの場合も、48時間以内にコオロギが死亡した。コオロギのカンジダ・アルビカンスとカンジダ・グラブラータに対する感受性は27度よりも37度において大きくなったが、クリプトコックス・ネオフォルマンスに対する感受性は27度と37度で同程度であった。クリプトコ

ックス・ネオフォルマンズの病原性遺伝子として知られる *cna1*, *gpa1*, *pka1* の欠損株は、親株と比較してコオロギに対する殺傷活性が低下していた。以上の結果は、フタホシコオロギが37度と27度のふたつの温度条件においてヒトの病原性真菌の感染モデルとして利用出来ること、ならびに、ヒト病原性真菌の病原性遺伝子の評価に有効であることを示唆している。カンジダ・アルピカンスとカンジダ・グラブラータは温度依存にコオロギに対する殺傷活性を上昇させる一方で、クリプトコックス・ネオフォルマンズのコオロギに対する殺傷活性は温度依存性を示さないことが明らかとなった。

(3) ヒト病原性細菌の温度依存性の動物殺傷に関わる遺伝子の同定
リステリア野生株のフタホシコオロギに対する半数致死用量は27度と比べて37度において6分の1に減少した。一方、リステリア LIPI-1 領域欠損株のフタホシコオロギに対する半数致死用量は、27度と比べて、37度において2分の1に減少した。以上の結果は、リステリアの温度依存性のコオロギに対する殺傷活性上昇に LIPI-1 領域が必要であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Kochi Y, Matsumoto Y, Sekimizu K, Kaito C.

Two-spotted cricket as an animal infection model of human pathogenic fungi.

Drug Discoveries and Therapeutics 22;11(5):259-266. (2017) 査読有

doi: 10.5582/ddt.2017.01052.

垣内力

非ほ乳動物を用いた感染モデル

細胞 49(11): 542-546 (2017) 査読無し

Kochi Y, Miyashita A, Tsuchiya K, Mitsuyama M, Sekimizu K, Kaito C.

A human pathogenic bacterial infection model using the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*.

FEMS Microbiol Lett. 363(15). pii: fnw163. (2016) 査読有

doi: 10.1093/femsle/fnw163.

Miyashita A, Kizaki H, Sekimizu K, Kaito C.

Body-enlarging effect of royal jelly in a non-holometabolous insect species, *Gryllus bimaculatus*.

Biol Open. 5(6):770-6. doi: 10.1242/bio.019190. (2016) 査読有

〔学会発表〕(計4件)

垣内力

人為的進化系を利用した細菌の病原性システムの理解

生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 シンポジウム 兵庫県神戸市 (2017)

垣内力

昆虫モデルを用いて解明する細菌の病原性発動システム

第99回日本細菌学会関東支部会総会 東京都港区(招待講演)(2016)

幸地悠斗、松本靖彦、関水久、垣内力

熱帯性コオロギを用いたヒト病原性真菌の感染モデルの確立

第99回日本細菌学会関東支部会総会 東京都港区(2016)

幸地悠斗、宮下惇嗣、関水久、垣内力

コオロギを用いた細菌感染モデルの確立

第16回東京大学生命科学シンポジウム 東京都目黒区(2016)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：関水 和久

ローマ字氏名：(SEKIMIZU, kazuhisa)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。