

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03914

研究課題名(和文)細胞内寄生菌の宿主内増殖と共生の双方向転換機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of bidirectional conversion mechanism of intracellular growth and symbiosis of intracellular bacteria

研究代表者

度会 雅久(Watarai, Masahisa)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：40312441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：病原細菌の多くは自然宿主内では病原性を発揮せず共生関係にあると考えられる。本研究はそのメカニズムを解析し、感受性宿主内における細胞内寄生菌の増殖と共生(休眠)の機構解明に応用することを目的としている。病原体の環境中での動態、特に自然宿主とその共生機構は不明な点が多い。本研究では、細胞内寄生菌の代表として野兔病菌およびノビシダ菌を用い、自然宿主および感受性宿主内の動態について比較解析を検討した。その結果、菌の増殖と共生に関与する複数の因子を同定し、菌と宿主の相互作用の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不明な点が多く残されている病原体の自然宿主とその共生機構を解明し、その成果を基盤とした感染制御法を構築することが本研究の目標である。継続的に研究を推進することにより、病原体が本来持つ生態、自然環境への適応能力、そして存在意義を明らかにすることができると考えられる。病原体は人や動物にとっては有害な存在であるが、自然界においては我々の考えが及ばない機能を有していることが想像される。感染症に対抗するためには、微生物が本来持つ機能を理解し、そこから学ぶことが必要である。本研究により、目標達成への手がかりを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Many pathogenic bacteria do not exhibit pathogenicity in natural hosts and are considered to be in a symbiotic relationship. The purpose of this study is to analyze the mechanism and apply it to elucidate the mechanism of proliferation and symbiosis (dormant) of intracellular bacteria in susceptible hosts. In this study, we used *Francisella tularensis* and *F. novicida* as representatives of intracellular bacteria, and examined comparative analysis of their behavior in natural and susceptible hosts. As a result, we identified multiple factors involved in intracellular growth and symbiosis, and clarified a part of the mechanism of bacteria-host interaction.

研究分野：病原細菌学

キーワード：病原細菌 自然宿主 共生因子 細胞内寄生 感染機構 感染制御

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内寄生菌は宿主が本来持っている種々の病原体排除機構を巧みに潜り抜け、宿主の細胞内へ侵入し、そこで増殖することができる。一方、病原細菌は抗生物質の投与により、生体内から排除することができる。しかし、細胞内寄生菌を殺滅する場合、薬剤を細胞内へ浸透させる必要があるため、高濃度の抗生物質を長期間投与しなければならない。これには宿主へ与える生理的負担に加え経済的負担が増加するという課題がある。さらに長期間の治療行為により薬剤耐性菌の出現が誘導され、社会問題となっている。薬剤耐性菌に有効な抗生物質を開発し続けることには限界があることが指摘されており、感染機構を基盤とした感染制御法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

細胞内寄生菌の感染機構について、多くの科学的知見が蓄積されている。その中で、菌が宿主細胞内へ侵入し増殖する現象(増殖ステージ)と菌が休眠(共生)状態になり、生体内のどこかに潜んでいる現象(共生ステージ)が同一宿主体内で起きることが知られている。共生ステージにある宿主は保菌しているが発症はしていないため、他の宿主への感染源となること、そして感染が再燃するという危険性がある。休眠とは増殖ステージから共生ステージへの転換であり、再燃とはその逆の現象であると考えられる。この共生ステージと増殖ステージの双方向転換は多くの細胞内寄生菌において認識されているが、そのメカニズムは不明な点が多い。

細菌の宿主内共生と増殖は表裏一体の関係であり、一連の現象として総合的に解析する必要がある。これまでの我々の解析により、自然宿主と感受性宿主の増殖ステージにおいて共通に関与する因子(病原因子)が認められている。生物としての効率性の観点から考えても、多くの病原因子は共通に機能しているものと考えられる。一方で共生ステージに関与する因子(共生因子)は不明な点が多いが、自然宿主と感受性宿主で多くが共通していると推察される。そこで我々が構築した自然宿主感染モデルを用いて解析することにより、これまで明らかにされていなかった共生因子という新たな機能因子群の存在が明らかになるものと考えられる。本研究では、細胞内寄生菌の代表として野兔病菌を用い、自然宿主内共生に関与する因子の同定とその機能解析により、共生ステージと増殖ステージの双方向転換システムのメカニズムを解明する。究極的には宿主内における菌の増殖、共生(休眠)、感染の再燃を防御する手法を見出すことを目標とする。具体的には以下の点について明らかにする。

### (1)自然宿主モデルとしてのカイコの有用性

野兔病菌はマダニなどの節足動物内に存在していることが知られている。節足動物モデルとしてのカイコの有用性を検討する。

### (2)自然宿主内共生に関与する因子(共生因子)の解明

フランシセラ属菌の2つの亜種(野兔病菌とノビシダ菌)を用いて、我々が自然宿主感染モデルとして構築したカイコへの共生および増殖に関与する因子を遺伝学的・分子生物学的手法を用いて探索し、同定された因子の機能を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1)野兔病菌株

細胞内寄生菌の中でも人獣共通感染症であり、国内における感染事例も報告されている野兔病の原因菌、*Francisella tularensis* に注目して解析を行う。*F. tularensis* にはいくつかの亜種が知られているが、*F. tularensis* subsp. *holarctica* 野兔病菌 LVS 株と *F. tularensis* subsp. *novicida* (ノビシダ菌) U112 株を用いる。LVS 株は野兔病菌の弱毒ワクチン株で、マクロファージ内で増殖し、マウスに接種すると数日で死亡すると言われている。野生株は強毒で解析には BSL3 の実験室、所属大学および所管省庁への手続等が必要であり、研究以外の不便さが障害となっている。病原性など菌の性状の解析には BSL2 で扱える LVS 株が一般的に用いられているため、本研究でも LVS 株を用いる。ノビシダ菌は野兔病菌と遺伝学的類似性は高いが、病原性が低いいため BSL2 に分類されている。

### (2)カイコ感染モデル

カイコ (*Bombyx mori*) は孵化後、幼虫が5回脱皮し、繭の中でサナギになる。蛾は繭から出て交尾し産卵する。このサイクルは約50日である。4回脱皮後の幼虫(4令虫)に野兔病菌を接種すると、共生関係になることが認められる。4~5令虫を経てサナギになるまでに約2週間を要するため、この間に解析を行う。

### (3)カイコ由来細胞モデル

カイコ由来の培養細胞株(繊維芽細胞) BmN4 を用いた感染実験系による変異株のスクリーニ

ングを行う。侵入した野兎病菌は共生し、カイコに共生できない変異株では、この細胞株内においても消化されるため、*in vitro*の実験系として使用可能である。

#### (4)変異株作製による共生因子の探索

カイコへの共生に必要な菌側因子を検索するために、トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法により、共生しない変異株の作出を行う。変異株を200株程度分離し、機能解析を行うことにより、共生因子群の存在を提示できるものと考えられる。

### 4. 研究成果

#### (1)カイコ感染モデルの確立

野兎病菌はヒトにおいて散発的に感染部の皮膚潰瘍や所属リンパ節の腫脹などの症状を引き起こし、人獣共通感染症の原因となることが知られている。自然宿主である野生動物や媒介節足動物などが菌を保有しており、重要な感染経路となっている。野兎病をコントロールするためには、環境中の病原体の動態を詳細に把握することが必須であると考えられる。しかしながら、節足動物体内における野兎病菌の動態はほとんど解明されていない。そこで本研究では、新たな節足動物モデルとしてカイコを用いて、体内における野兎病菌の動態の解析を行った。

カイコの体内に直接大腸菌および野兎病菌を注入し体内菌数を経時的に測定した結果、大腸菌は速やかに体内から排除されるのに対し、野兎病菌では体内菌数が1週間以上維持されることが確認された。また蛍光蛋白を導入した野兎病菌を用いた実験により、血球細胞内に侵入していることが確認された。さらにカイコにおける生体防御反応として知られている体液のメラニン化および体組織へのノジュールの付着に着目し実験を行ったところ、野兎病菌の感染に対してはこれら反応が抑制されていることが明らかとなった。野兎病菌は節足動物の体内において長期間生存するための特異的な機構を有しており、環境中における広い範囲の節足動物を宿主として、体内で生存・増殖できる可能性が示唆された。

#### (2)野兎病菌のカイコ体内の動態

カイコへの共生に必要な菌側因子を検索するために、トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法により、共生しない変異株の作出を行った。カイコの中で維持されず、短期間に消失する変異株が複数得られた。これらの変異株の中にはマクロファージ内で増殖するものとしけないものが認められた。共生因子は既知の増殖ステージに関与する病原因子とは別の機能因子群の可能性も考えられた。カイコは動物が持つ臓器に相当する器官を持つ。脂肪体（肝臓）、マルピーギ管（腎臓）、ヘモリンパおよびそれに含まれる細胞、免疫応答の結果形成されるノジュールに菌が含まれる。特にヘモリンパおよびそれに含まれる細胞内に野兎病菌は多く存在し、共生関係成立に重要な現象であると考えられた。一方においてノビシダ菌をカイコに感染させると共生は認められず、菌は体内で増殖しカイコは死亡する。ノビシダ菌は野兎病菌と遺伝学的類似性は高いが、病原性が低いためBSL2に分類されている。野兎病菌とノビシダ菌のマクロファージ内動態とそれに関わる病原因子は類似している場合が多いが、カイコ内動態は異なることが示された。

#### (3)Soluble lytic transglycosylase (SLT)の機能解析

マクロファージ内増殖およびカイコへの共生に必要な菌側因子を検索するために、トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法により、細胞内増殖および共生しない変異株の作出を行った。マクロファージおよびカイコの中で維持されず、短期間に消失する変異株が複数得られた。マクロファージ内での増殖能が低下した変異株に注目し、変異部位の解析を遺伝学的手法により行った。その結果、soluble lytic transglycosylase (SLT) をコードする遺伝子が変異していることが明らかとなった。そこで、*slt* 遺伝子を欠失したノビシダ菌を作製し、人由来マクロファージ THP-1 細胞を用いて細胞毒性試験を行った。欠損株は親株に比べ、THP-1 細胞への毒性が低下していた。また、欠損株は親株に比べ細胞内増殖能も低下していることが認められた。THP-1 細胞内において、欠損株は感染の早期にファゴソームから脱出するが、オートファゴソームに取り込まれる。その後リソソームと融合し消化される。欠損株は親株に比べ、感染時に tumor necrosis factor-、interleukin (IL)-6、IL-1 などのサイトカインの産生を誘導することが示された。

#### (4)Membrane-bound lytic murein transglycosylase(MltA)の機能解析

さらに、マクロファージおよびカイコの中で維持されず、短時間に消失する変異株、8株の変異部位を解析したところ、それぞれ *slt*、*purD*、*iglB*、*ampG* (2株)、*purH*、*mltA*、*ggt* 遺伝子が変異していることが明らかとなった。そこでこれまで報告例のない Membrane-bound lytic murein transglycosylase(MltA)に着目し、*mltA* 遺伝子を欠失したノビシダ菌を作製し、性状解析を行なった。変異株は親株に比べカイコ体内および細胞内における増殖能の低下、抗菌ペプチド産生の増加が認められた。MltA はノビシダ菌の宿主免疫抑制機能に関与していることが推察された。ヒト由来マクロファージ THP-1 細胞を用いた解析においても、変異株の細胞内増殖能の低下が認められた。細胞内寄生菌の増殖・共生の機構解明にカイコモデルが有用であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nakamura Takemasa, Shimizu Takashi, Inagaki Fumiya, Okazaki Shoma, Saha Shib Shankar, Uda Akihiko, Watanabe Kenta, Watarai Masahisa	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of Membrane-Bound Lytic Murein Transglycosylase A (MltA) as a Growth Factor for <i>Francisella novicida</i> in a Silkworm Infection Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 581864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.581864	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe Kenta, Higuchi Yusei, Shimura Mizuki, Tachibana Masato, Fujishima Masahiro, Shimizu Takashi, Watarai Masahisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Peculiar Paramecium Hosts Fail to Establish a Stable Intracellular Relationship With <i>Legionella pneumophila</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 596731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.596731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Takemasa, Shimizu Takashi, Uda Akihiko, Watanabe Kenta, Watarai Masahisa	4. 巻 14
2. 論文標題 Soluble lytic transglycosylase SLT of <i>Francisella novicida</i> is involved in intracellular growth and immune suppression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0226778 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0226778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishida Takashi, Nakagawa Natsuko, Watanabe Kenta, Shimizu Takashi, Watarai Masahisa	4. 巻 2019
2. 論文標題 Attenuated <i>Legionella pneumophila</i> Survives for a Long Period in an Environmental Water Site	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/8601346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Takashi, Otonari Shiho, Suzuki Jin, Uda Akihiko, Watanabe Kenta, Watarai Masahisa	4. 巻 8
2. 論文標題 Expression of Francisella pathogenicity island protein intracellular growth locus E (IglE) in mammalian cells is involved in intracellular trafficking, possibly through microtubule organizing center	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MicrobiologyOpen	6. 最初と最後の頁 e00684 ~ e00684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mbo3.684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saha Shib Shankar, Uda Akihiko, Watanabe Kenta, Shimizu Takashi, Watarai Masahisa	4. 巻 123
2. 論文標題 RtxA like protein contributes to infection of Francisella novicida in silkworm and human macrophage THP-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 74 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micpath.2018.06.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Kenta, Suzuki Haruo, Nishida Takashi, Mishima Manami, Tachibana Masato, Fujishima Masahiro, Shimizu Takashi, Watarai Masahisa	4. 巻 94
2. 論文標題 Identification of novel Legionella genes required for endosymbiosis in Paramecium based on comparative genome analysis with Holospora spp.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Ecology	6. 最初と最後の頁 fiy162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsec/fiy162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Takashi, Hara Naho, Watanabe Kenta, Shimizu Takashi, Fujishima Masahiro, Watarai Masahisa	4. 巻 9
2. 論文標題 Crucial Role of Legionella pneumophila ToIC in the Inhibition of Cellular Trafficking in the Protistan Host Paramecium tetraurelia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.00800	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saha Shib Shankar, Suzuki Jin, Uda Akihiko, Watanabe Kenta, Shimizu Takashi, Watarai Masahisa	4. 巻 113
2. 論文標題 Silkworm model for Francisella novicida infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 94 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micpath.2017.10.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 仲村岳真、清水隆、渡邊健太、度会雅久
2. 発表標題 野兔病菌Soluble lytic transglycosylaseは細胞内増殖および細胞傷害性に関与する
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 度会雅久
2. 発表標題 自然宿主と野兔病菌の共生関係
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣文弥、渡邊健太、宇田晶彦、清水隆、度会雅久
2. 発表標題 カイコモデルを用いた野兔病菌の病原遺伝子の探索
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Shimizu, Kenta Watanabe, Akihiko Uda, Masahisa Watarai
2. 発表標題 Analysis of Francisella effector IgIC
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.vet.yamaguchi-u.ac.jp/members/watarai-p.html>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
バングラデシュ	Patuakhali Sci. and Technol. Univ.		