

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07556

研究課題名(和文) カイコモデルを用いた細菌の節足動物内生生存戦略及び病原因子の解明

研究課題名(英文) Analysis of survival strategy and pathogenic factors of bacteria using silk worm infection model

研究代表者

清水 隆 (Shimizu, Takashi)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：40320155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は野兔病菌を節足動物媒介性病原体のモデルとして、節足動物(カイコ)内での増殖メカニズム、ヒトを含む宿主細胞内での増殖メカニズムを解明することを目的とした。その結果、野兔病菌の*mltA*遺伝子が節足動物の免疫機構を回避し、節足動物内で増殖するために必須であることが明らかとなった。また、*slt*遺伝子はヒト細胞内において免疫機構、およびオートファジーによる食作用を回避し、細胞内で増殖するために重要であることが明らかとなった。また野兔病菌感染に重要な宿主因子を同定するためにCRISPR遺伝子編集をもちいて野兔病菌感染に重要な宿主因子候補をいくつか同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の地球温暖化の影響で節足動物媒介性の感染症は拡大している。しかしながら節足動物媒介細菌感染症において、節足動物における最近の生存戦略や病原性への影響は殆ど解明されていない。本研究ではマダニ媒介性の野兔病菌(*Francisella tularensis*)を細菌モデルとして、カイコ(*Bombyx mori*)を節足動物モデルとして使用することにより、病原性細菌の節足動物内での生存戦略、ヒトを含む宿主細胞内での増殖メカニズムの一端を解明することに成功した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the mechanisms of growth within arthropods (silkworms) and host cells (including humans), using *Francisella* as a model for arthropod-borne pathogens.

The results revealed that the *mltA* gene of *Francisella* is essential for the bacteria to evade the arthropod immune system and to proliferate within arthropods. The *slt* gene was also found to be important for growth in human cells, bypassing the immune system and autophagy.

In addition, we used CRISPR gene editing to identify several candidate of host factors that are important for the infection of *Francisella*.

研究分野：細菌学

キーワード：野兔病 *Francisella* カイコ 細胞内増殖 CRISPR

1. 研究開始当初の背景

近年の地球温暖化の影響によって媒介節足動物の生息域や活動期間が変化した結果、節足動物媒介性感染症の発生地域や発生件数は現在急速に拡大している。実際、日本においてもマダニ媒介性の重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスによる SFTS や、カ媒介性のデングウイルスによるデング熱の発生が報告され、問題となっている。これらの事例は、節足動物媒介性の細菌性新興感染症および野兔病、ライム病、ペスト等の再興感染症の将来的な発生を強く示唆するものである。

しかしながら、節足動物におけるこれら病原体の生存戦略および病原性への影響はほとんど解明されていない。今後も拡大していくと予想される節足動物媒介性感染症をコントロールするためには、節足動物内での病原性細菌の動態や、節足動物媒介による人に対する病原性への影響を詳細に把握することが必要である。

2. 研究の目的

本研究ではマダニ媒介性の野兔病菌 (*Francisella tularensis*) を細菌モデルとして、カイコ (*Bombyx mori*) を節足動物モデルとして使用することにより、病原性細菌の節足動物媒介によるヒトに対する病原性への影響、および節足動物内での生存戦略を解明する。

3. 研究の方法

本研究では次の3項目について研究を行った。

- (1) カイコを用いた宿主内での定着・増殖に重要な因子の同定
- (2) カイコを用いた節足動物内媒介による病原性への影響の検討
- (3) 野兔病菌の宿主内での増殖メカニズムの解明

- (1) カイコを用いた宿主内での定着・増殖に重要な因子の同定

カイコ感染モデルの開発

これまでにカイコへの野兔病菌 *F. tularensis* の感染実験の結果から、亜種 *holarctica* (*F. holarctica*) はカイコに感染後、カイコの免疫機構を抑制し、定着することが確認された。このことは、*F. holarctica* とカイコが野兔病菌の節足動物への定着機構のモデルとして使用できることを示唆していた。また、亜種 *novicida* (*F. novicida*) はカイコに感染後カイコ内で増殖し、カイコを死亡させた。このことから、*F. novicida* とカイコは野兔病菌の節足動物内での増殖を検討するツールとして使用できることが明らかとなった。

トランスポゾン変異株ライブラリの作成

トランスポゾン EzTn5 用ベクターに野兔病菌由来抗生物質耐性遺伝子を導入し、野兔病菌用のトランスポゾンを作製する。精製トランスポゼースと共にエレクトロポレーションにより *F. novicida* に導入し、ランダム変異株を得る。

カイコ感染モデルを利用した病原性因子の同定

F. novicida のカイコ感染モデルでは菌が増殖し、カイコは死亡する。このことから *F. novicida* とカイコの組み合わせにより、節足動物内での増殖因子のスクリーニングに適していると考えられる。また、ヒトに対する病原因子であるいくつかの遺伝子を欠損させると、カイコを死亡させなくなることが予備実験で確認されている。このことは *F. novicida* のカイコ感染モデルはヒトに対する病原因子を同定するツールとしても使用できることを示唆している。そこで、*F. novicida* にトランスポゾンを導入しランダム変異株を得る。カイコに感染させ、カイコが死なない株を選別することにより、節足動物内での増殖因子、病原因子となり得る候補遺伝子を同定する。該当遺伝子の変異株を作成し、細胞株及びマウスを用いて感染実験を行い、病原性の有無を確認する。

- (2) カイコを用いた節足動物内媒介による病原性への影響の検討

節足動物を経由することでヒトに対する病原性に影響をおよぼすかどうかを調べるために、*F. holarctica* および *F. novicida* をカイコに感染させる。カイコをホモジナイズし、菌量を量るとともにマウスに摂取し、死亡率を算出する。また脾臓や肝臓の菌数を測定する。培地で培養した同量の菌を同様にマウスに摂取した場合と比較検討する。カイコを経由することにより病原性が増強した場合、培地で培養した菌と、カイコ体内で維持・増殖された菌の RNA を精製し、マイクロアレイ解析を行うことで、カイコ体内で特異的に発現が上昇する遺伝子を同定する。それら遺伝子の変異株を作成し、病原性への影響を検討する。

- (3) 野兔病菌の宿主内での増殖メカニズムの解明

トランスポゾン変異株ライブラリによる病原因子のスクリーニング

野兎病菌の細胞内増殖因子を同定するため、トランスポゾン変異株ライブラリを THP-1 細胞に感染させ、菌が増殖できない(細胞が死滅しない)変異株をスクリーニングし、その責任遺伝子を同定する。

VI 型分泌機構の解析

野兎病菌の宿主細胞内での細胞内増殖に重要である遺伝子は *Francisella pathogenic island* (FPI) にコードされており、VI 型分泌機構と相同性を有している。しかしながら野兎病菌の VI 型分泌機構はどのような機構で宿主内の細胞内増殖や節足動物体内での生存競争に作用しているのかは全く解っていない。そこで FPI にコードされている遺伝子の変異株を作製し、カイコ体内での生存、および宿主細胞内への侵入増殖に関与する遺伝子を探索するとともに、関与遺伝子がどのようにカイコや宿主の細胞に作用するのかを、two-hybrid 解析や免疫沈降法を用いて検討したい。申請者はすでに FPI にコードされる遺伝子のうち *iglE* 遺伝子の機能解析を終えている。本研究では *iglC* 遺伝子に着目し、機能解析を行う。

細胞侵入・細胞内増殖に重要な宿主因子の同定

野兎病菌の細胞侵入や細胞内増殖に重要な宿主側の因子はこれまで報告されていない。節足動物内、ヒト細胞内での増殖に必要な細胞側の因子を同定するために、CRISPR 技術をもちいた検討を行う。これまでの研究から *F. novicida* をヒト単球の細胞株である THP-1 細胞や、カイコ由来細胞株である BmN4 細胞に感染させると細胞内で菌が増殖し、細胞は死滅する。レンチウイルスを用いて CRISPR およびガイド RNA ライブラリをこれらの細胞に導入し、ランダムな変異をもった細胞集団を作成する。これらの細胞に *F. novicida* を感染させ、増殖する細胞をスクリーニングする。この細胞から回収したレンチウイルスをこれらの細胞に再び感染させ、*F. novicida* によって死滅しない細胞集団を回収する。この工程を複数回繰り返した後、ウイルスの持つガイド RNA の配列を決定することにより、*F. novicida* の増殖および細胞障害に必須の細胞側因子を同定する。

4. 研究成果

(1) カイコを用いた宿主内での定着・増殖に重要な因子の同定

野兎病菌の節足動物内での増殖機構は全く解明されていない。*F. novicida* はカイコに感染後カイコ内で増殖しカイコを死亡させるため、この組み合わせを利用して野兎病菌の節足動物内増殖因子を同定した。*F. novicida* のトランスポゾン変異株 750 株からなるライブラリーからカイコが死亡しない変異株をスクリーニングした。その結果、8 個の遺伝子が節足動物内での増殖に必須であることが明らかとなった(図 1)。

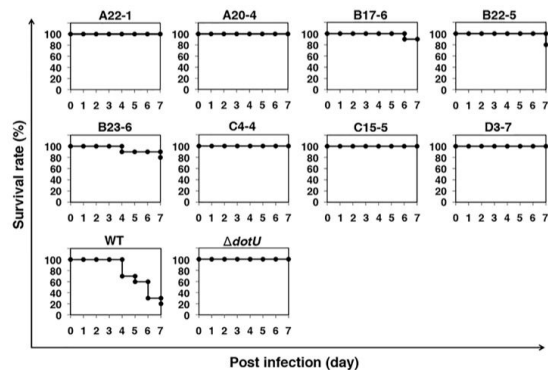


図 1. カイコに病原性を示さない変異株のスクリーニング

その中で、これまでに病原因子としての報告がなかった *mltA* 遺伝子に注目し、解析した。*mltA* は membrane-bound lytic murein transglycosylase A をコードし、ペプチドグリカンの分解や、タンパク質複合体の膜への埋め込みに関与することが知られている。*mltA* 欠損株の感染ではカイコの死亡率が減少した(図 2)。また、欠損株ではカイコ体内、カイコ由来細胞株 BmN4 細胞内での増殖が减弱していた(図 3)。*mltA* 欠損株感染においてはカイコ体内における抗菌ペプチドの産生が増強しており、*mltA* がカイコの免疫抑制を介してカイコへの病原性に関与していることが示唆された。

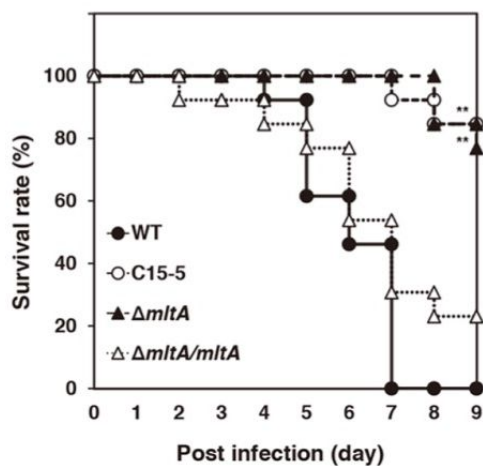


図 2. *mltA* 欠損株はカイコに対する病原性が减弱している。

また、*mltA* 欠損株はヒトマクロファージ細胞株 THP-1 細胞においても増殖が減弱していた(図 4)。このことから *mltA* 遺伝子は宿主節足動物及びヒト体内において定着・増殖に関与する新規の病原因子であることが明らかとなった。これらの結果から、カイコモデルは節足動物内増殖モデルとして有効であるだけでなく、ヒトに対する病原因子の探索にも有用であることが示唆された。この結果は Front Cell Infect Microbiol 誌に掲載された。

(2) カイコを用いた節足動物内媒介による病原性への影響の検討

節足動物を経由することでヒトに対する病原性に影響をおよぼすかどうかを調べるために、*F. holarctica* および *F. novicida* をカイコに感染させた。カイコから回収した菌をマウスや細胞株に感染させ、病原性への影響を評価した。しかしながら、細胞内増殖や、マウスでの病原性、バイオフィーム産生量等に顕著な差を見出すことはできなかった。その理由として、カイコ体内にいる菌体は細胞内で増殖していることが多く、回収するのが難しいことがあげられる。回収した後においても、カイコ由来の細胞やカイコの体液が混入するため、濁度を測定することが難しく、培地で培養した菌と比較して、菌量を同等に調整することが困難であった。節足動物を介することによる病原性への影響を評価するにあたり、これらの問題は今後解決すべき点となった。

(3) 野兎病菌の宿主内での増殖メカニズムの解明

細胞内増殖因子の同定

野兎病菌の細胞内増殖因子を同定するため、トランスポゾン変異株ライブラリを THP-1 細胞に感染させ、菌が増殖できない(細胞が死滅しない)変異株をスクリーニングし、細胞内増殖が

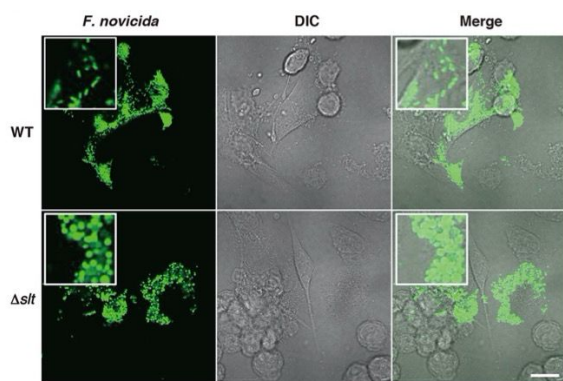


図 5. *slt* 欠損株はヒトマクロファージ由来 THP-1 細胞内で増殖できない。

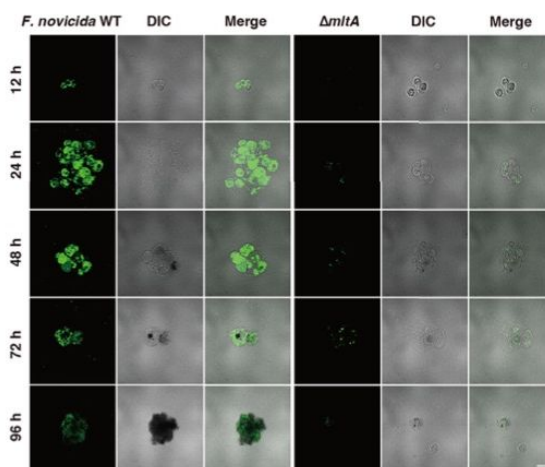


図 3. *mltA* 欠損株はカイコ体内での増殖能が減弱している。

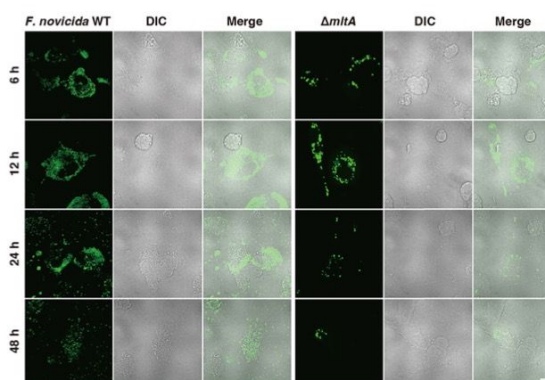


図 4. *mltA* 欠損株はヒトマクロファージ由来 THP-1 細胞内でも増殖できない。

減弱した変異株 11 株を得た。トランスポゾンによる変異の導入部位を解析し、そのなかで *slt* 遺伝子に着目した。*slt* は soluble lytic murein transglycosylase をコードする遺伝子で、ペプチドグリカンの分解やタンパク質複合体の膜への挿入に重要であることが知られている。*slt* の変異株は THP-1 細胞の中で増殖することができずに(図 5) オートファゴソームのマーカである LC3 と細胞内で共局在が観察された(図 6)。また、感染細胞から放出される炎症性サイトカインが増強した。これらのことから *slt* は野兎病菌の免疫抑制に関与し、感染後にオートファゴソームによる認識、溶菌から逃れるために重要であることが明らかとなった。この結果は Pros One 誌に掲載された。

VI 型分泌機構の解析

VI 型分泌機構のエフェクタータンパク質と考えられる *iglC* 遺伝子の解析を行った。*iglC* 欠損株では菌の細胞内増殖能が減弱した。免疫沈降と pull-down 解析の結果 *IgIC* は宿主の HSC70 タンパク質と結合することが明らかとなった。HSC70 は野兔病菌の感染によって核に移行するが、*IgIC* も同様に核に移行した(図7)。核に移行した *IgIC* が宿主の遺伝子発現をコントロールするかどうかを調べるために RNA-seq 解析を行った。その結果、*IgIC* 発現細胞では細胞内情報伝達や免疫反応に関するいくつかの遺伝子の発現が有意に減少していた。現在これらの遺伝子の野兔病菌感染に対する影響を検討中である。

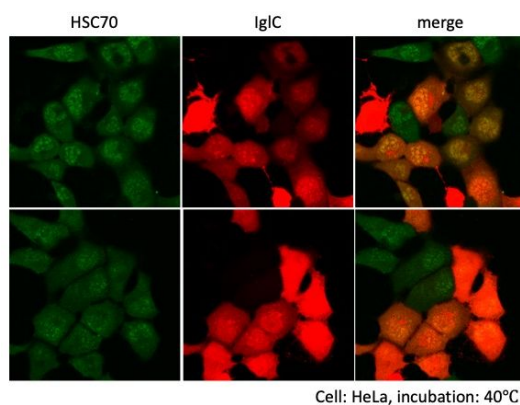


図7. *IgIC* は HSC70 と共に核に移行する。

を入れた細胞集団を作成した。この細胞集団に野兔病菌の強毒亜種である subsp. *tularensis* (*F. tularensis*)を感染させ、死滅せずに増殖できる細胞をスクリーニングした。*F. tularensis* 感染により死滅しない細胞にどのガイド RNA が発現しているのかをシーケンス解析により解析し、同じガイド RNA により同定した遺伝子の破壊株を作成した。これまでにすでに5種類の候補遺伝子を同定済みである。現在、この破壊株に *F. tularensis* を感染させることにより野兔病菌感染にあたる影響を検討中である。

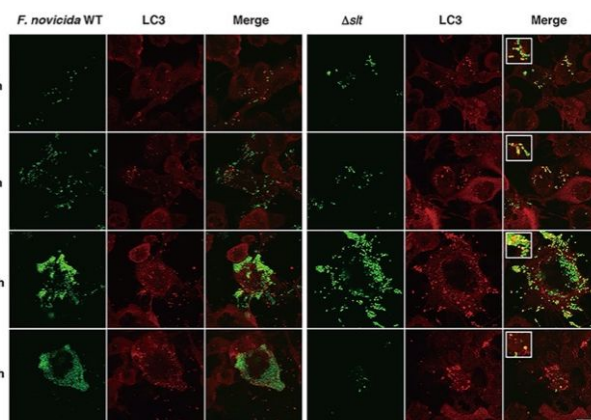


図6. *sIt* はオートファゴソームからの脱出に重要。

細胞侵入・細胞内増殖に必要な宿主因子の同定

ヒト細胞内での増殖に必要な細胞側の因子を同定するために、CRISPR 技術をもちいた検討を行った。野兔病菌は THP-1 細胞などのマクロファージ系の細胞にのみ感染・増殖を行うことが知られ、遺伝子編集などを容易に行うことが可能な HeLa 細胞などには感染させることができなかった。本研究ではまず、HeLa 細胞に野兔病菌を感染させる系を構築するために、HeLa 細胞に Fc 受容体を発現させた HeLa-FcR を作成した。野兔病の LPS に対する抗体存在下で HeLa-FcR に感染させると、野兔病が HeLa-FcR 細胞内に取り込まれ、細胞内で増殖し、細胞を死滅させることが確認された。この系を用いて、HeLa-FcR 細胞にガイド RNA ライブラリをもちいて CRISPR によりランダムに変異

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2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 -
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 -

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
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 隆、仲村岳真、渡邊健太、宇田晶彦、度会雅久
2. 発表標題 野兔病菌病原因子の同定と機能解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 隆、渡邊健太、宇田晶彦、度会雅久
2. 発表標題 カイコ感染モデルを用いた野兔病菌病原因子の探索
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 清水 隆、仲村岳真、渡邊健太、宇田晶彦、度会雅久
2. 発表標題 野兔病菌Soluble lytic transglycosylase SLTは免疫抑制および細胞内増殖に関する
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 隆、渡邊健太、宇田晶彦、度会雅久
2. 発表標題 宿主遺伝子発現を調整する野兔病菌エフェクターの解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 隆、渡邊健太、宇田晶彦、度会雅久
2. 発表標題 宿主の遺伝子発現を調整する野兔病菌エフェクターIgICの解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------