

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19435

研究課題名（和文）In vivo進化実験により病原性細菌出現の分子基盤に迫る

研究課題名（英文）Investigating emergence of pathogenic bacteria using in vivo experimental evolution

研究代表者

垣内 力（Kaito, Chikara）

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：60420238

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：病原性細菌の病原性機能の進化を理解するためには、様々な感染環境のストレスに対する細菌の回避機構を理解する必要がある。本研究では、様々な感染環境において細菌が暴露されるストレスについて、細菌の耐性に関わる遺伝子の探索をおこなった。免疫細胞による殺菌に関わる亜鉛について大腸菌の耐性株を探索することにより、リボソームタンパク質の欠損が大腸菌の亜鉛耐性化をもたらすことを明らかにした。また、抗菌ペプチドであるコリスチンについて感受性株を探索することにより、AMP合成に関わるアデニロコハク酸合成酵素の欠損が大腸菌の抗菌ペプチド感受性、ならびに抗生物質感受性をもたらすことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボソームタンパク質の遺伝子欠損株が亜鉛耐性を示した知見から、リボソームの構造異常や翻訳機能の異常が感知され、亜鉛ストレスに対する細菌の耐性を発動させる機構が存在すると推定される。これまでに複数の細菌種において、アデニロコハク酸合成酵素の遺伝子欠損株が病原性を低下することが知られていたが、そのメカニズムは明らかではなかった。本研究の知見から、アデニロコハク酸合成酵素欠損株の病原性低下の一要因として、宿主体内で暴露される抗菌ペプチドに感受性となることが考えられる。薬剤によるアデニロコハク酸合成酵素の阻害は、宿主免疫に対する感受性、病原性低下、抗生物質感受性を引き起こすと期待できる。

研究成果の概要（英文）：To understand the evolution of bacterial virulence functions, it is necessary to understand the mechanisms by which bacteria evade the stresses of various infectious environments. In this study, we searched for genes involved in bacterial resistance to stresses to which bacteria are exposed in various infectious environments. By searching for resistant strains of *Escherichia coli* for zinc, which is involved in bactericidal activity by immune cells, we found that a deficiency of ribosomal proteins leads to zinc resistance in *E. coli*. We also searched for susceptible strains of colistin, an antimicrobial peptide, and found that a deficiency in adenylosuccinate synthase, which is involved in AMP synthesis, causes antimicrobial peptide susceptibility in *E. coli*.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソームタンパク質 アデニロコハク酸合成酵素

1. 研究開始当初の背景

病原性細菌は動物の体内に侵入し、免疫システムに抵抗しながら増殖し、動物を殺傷する。一方、土壌などの環境には非病原性の環境細菌が多数存在しており、少なくともこれらの細菌の一部が多細胞生物の体内環境で生存・適応するために進化することで、病原性を獲得してきたと考えられる。しかしながら、細菌の病原性機能獲得が進化上どのようになされてきたのかは未だほとんど理解されておらず、病原性細菌の進化プロセスを理解するためには、様々な病原体の進化情報を収集する必要がある。

2. 研究の目的

感染環境に存在する様々なストレスに対して細菌が耐性を獲得するメカニズムを明らかにすることで、病原性進化の鍵となる細菌-環境間の相互作用を理解する。さらに、薬剤投与や病原体以外の微生物の存在など様々な感染環境において病原性細菌の実験的進化を行い、病原性細菌の多様な進化パターンを分子レベルで網羅的に捉え、病原性機能獲得を引き起こす細菌分子群とその作用の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 病原性上昇を引き起こす遺伝子変異の網羅的探索：感染環境で細菌が暴露される様々なストレス(金属イオン、抗菌ペプチド等)に対して細菌の耐性に関わる遺伝子変異を探索する。また、様々な感染環境を模したカイコ(抗生物質投与、競合細菌存在、糖尿病状態)および通常のカイコに対して、変異原処理をした細菌(大腸菌、緑膿菌、枯草菌、黄色ブドウ球菌)を注射し、感染死したカイコから細菌を分離する操作を繰り返す。得られた高病原性変異株の全ゲノム解析と遺伝学的解析を行い、病原性上昇を導く遺伝子変異を網羅的に同定する。病原性上昇はマウス感染モデルでも検討し、哺乳動物に対しての病原性上昇を明らかにする。

(2) 病原性上昇の分子メカニズムの解明：遺伝子変異による細菌分子群の変化(RNA、タンパク質、多糖類、代謝物)と宿主との相互作用プロセスの変化(宿主細胞の傷害性、免疫機構からの防御能、宿主細胞への接着能、宿主免疫の過剰活性化能)を解析し、病原性上昇の原因となる分子メカニズムを解明する。アミノ酸置換変異が起きた遺伝子産物については、遺伝子産物の生化学的性状の変化を解析する。

(3) 病原性細菌進化の特異性と普遍性の解析：高病原性変異株の表現型と遺伝子型の時系列変化(感染環境、細菌種、病原性上昇を導く遺伝子変異、細菌分子の発現、免疫反応、病原性)についてデータベース構築を行い、進化の起源として用いた細菌種の違い、ならびに感染環境の違いが病原性上昇メカニズムに対して与える影響を解析し、病原性細菌の進化メカニズムの普遍性と特異性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) リボソームタンパク質の欠損による亜鉛耐性化

環境中のストレスに対して耐性化を引き起こす遺伝子変異の中から、病原性上昇を導く遺伝子変異を同定する目的で、金属ストレスに対する耐性化をもたらす遺伝子変異の探索をおこなった。亜鉛は細菌にとって必要不可欠であると同時に過剰量では毒性を示す。また、免疫細胞は侵入した病原性細菌を高濃度亜鉛に暴露することで、殺菌するシステムを有している。そのため細菌は取り込みや排出を調節して細胞内亜鉛濃度を維持している。大腸菌遺伝子欠損株ライブラリーを用いて亜鉛耐性株を探索した結果、リボソームタンパク質 RpmJ の欠損が大腸菌の亜鉛

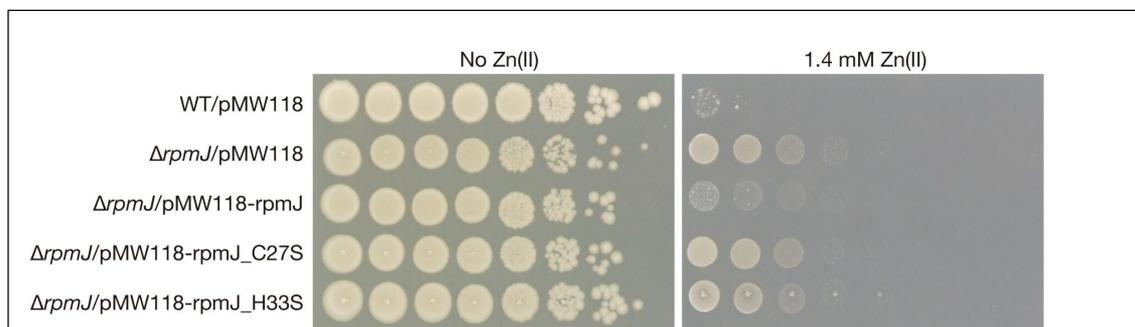


図1 *rpmJ* 欠損株は亜鉛耐性を示す

野生株(WT/pMW118)、*rpmJ* 欠損株($\Delta rpmJ/pMW118$)、*rpmJ* 遺伝子で相補した *rpmJ* 欠損株($\Delta rpmJ/pMW118-rpmJ$)、アミノ酸置換変異型 *rpmJ* 遺伝子で相補した *rpmJ* 欠損株($\Delta rpmJ/pMW118-rpmJ_{C27S}$ 、 $\Delta rpmJ/pMW118-rpmJ_{H33S}$) の一晚培養液の 10 倍段階希釈液を亜鉛を含む寒天培地、および亜鉛を含まない寒天培地にスポットし、培養した。

(PLOS ONE 18(3):e0277162.2023)

耐性を導くことを見出した(図1), *rpmJ* 欠損株はタンパク質合成阻害剤に対する感受性を示し、翻訳の忠実度が変化していたことから、RpmJ の欠損によりリボソーム機能が変化していると考えられた。過剰亜鉛条件下において、*rpmJ* 欠損株の細胞内亜鉛濃度が低下していたことから、RpmJ の欠損は細胞内亜鉛濃度の低下によって亜鉛耐性を導くことが示唆された。さらに、RpmJ 以外のリボソーム関連因子が亜鉛耐性に関与するか解析したところ、複数種類のリボソームタンパク質やリボソーム成熟因子の欠損株が亜鉛耐性を示すことが明らかとなった。以上の結果は、リボソームの機能異常が大腸菌の亜鉛耐性化を導くことを示唆している。

rpmJ 欠損株の病原性をカイコ感染モデルにおいて評価したところ、病原性の変化は認められなかった。今後は、亜鉛暴露による殺菌がおこる感染局面に焦点をあてて、亜鉛耐性化による病原性上昇がみられるか引き続き検討していきたい。

(2) アデニロコハク酸合成酵素の欠損による抗菌ペプチド耐性化

カイコ感染モデルにおいて高病原性を示す細菌の遺伝子変異株が陽イオン性の抗菌物質に耐性を示すことから、細菌の病原性上昇には宿主免疫系の陽イオン性抗菌ペプチドに対する細菌の耐性化が関わりと想定される。大腸菌遺伝子欠損株ライブラリーを用いて、カチオン性の環状ペプチドであるコリスチンに対して感受性を示す株の探索をおこなった結果、*de novo* プリン塩基合成の最終段階である、IMP からアデニロコハク酸の合成を担う酵素 PurA の欠損株がコリスチン感受性株の1つとして得られた。アデニロコハク酸は AMP となり、ADP へ変換されたあと、ATP の基質となる。*purA* 欠損株においては、細菌内の ATP 量が野生株に比べ減少していることが明らかとなった。ATP 合成はプロトン輸送と共役し、膜電位形成に関わる。蛍光色素 DiOC2(3) の標識アッセイにより膜電位を測定したところ、*purA* 欠損株においては野生株に比べ細胞膜が過分極していることが示唆された(図2)。さらに、脱共役剤である CCCP を添加したところ、*purA* 欠損株における過分極は失われ、コリスチンに対する感受性も失われた(図3)。*purA* 欠損株は膜電位依存に取り込まれることが知られるアミノグリコシド系抗生物質であるカナマイシンとゲンタマイシンにも感受性を示した。以上の結果は、AMP 合成酵素 PurA の欠損が ATP 合成の低下と細胞膜の過分極を導き、大腸菌のコリスチン感受性化を引き起こすことを示唆している。

purA 欠損株は野生株に比べ栄養培地中での増殖速度の低下が観察されたため、カイコ感染モデルにおける病原性への影響は検討しなかった。

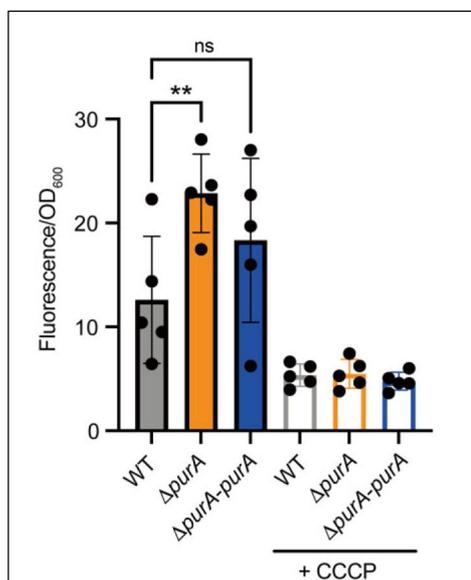


図2 *purA* 欠損株は過分極を示す
野生株 (WT) *purA* 欠損株 ($\Delta purA$) *purA* 遺伝子で相補した *purA* 欠損株 ($\Delta purA-purA$) を培養し、CCCP で処理または未処理後、膜電位依存に取り込まれる蛍光色素 DiOC2(3) で染色をおこなった。
(FEMS Microbiol Lett. 371:fnae007. 2024)

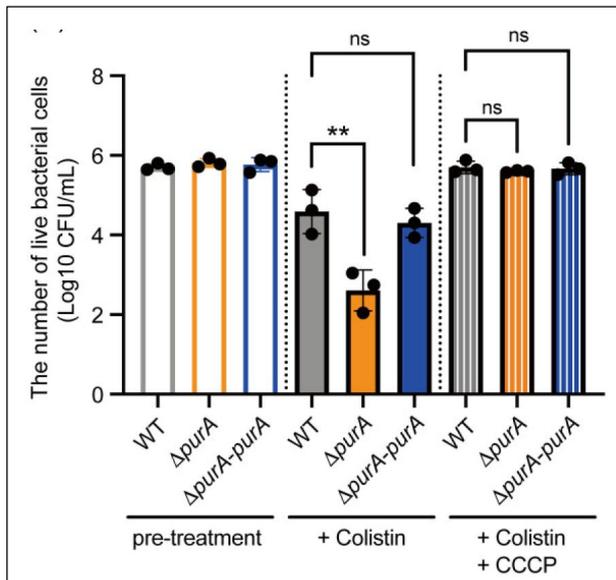


図3 *purA* 欠損株のコリスチン感受性は CCCP 処理により失われる
野生株 (WT) *purA* 欠損株 ($\Delta purA$) *purA* 遺伝子で相補した *purA* 欠損株 ($\Delta purA-purA$) を培養し、CCCP 存在下または非存在下でコリスチン (0.8 $\mu\text{g/mL}$) に暴露した後、生菌数を測定した。
(FEMS Microbiol Lett. 371:fnae007. 2024)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kano Tomonori, Ishikawa Kazuya, Furuta Kazuyuki, Kaito Chikara	4. 巻 371
2. 論文標題 Knockout of adenylosuccinate synthase purA increases susceptibility to colistin in Escherichia coli	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 fnae007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fnae007	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 Nakajima Isana, Fukuda Ken, Ishida Waka, Kishimoto Tatsuma, Kuwana Aozora, Suzuki Takashi, Kaito Chikara, Yamashiro Kenji	4. 巻 26
2. 論文標題 Staphylococcus aureus-derived virulent phenol-soluble modulin triggers alarmin release to drive IL-36-dependent corneal inflammation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbes and Infection	6. 最初と最後の頁 105237 ~ 105237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micinf.2023.105237	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 Nigo Fuki, Nakagawa Ryosuke, Hirai Yuuki, Imai Lina, Suzuki Yutaka, Furuta Kazuyuki, Kaito Chikara	4. 巻 209
2. 論文標題 Staphylococcus aureus MazG hydrolyzes oxidized guanine nucleotides and contributes to oxidative stress resistance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 52 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2023.02.001	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 Furuta Kazuyuki, Yoshioka Takehiro, Nishikaze Kana, Yoshikawa Noriko, Nakamura Kazuki, Kaito Chikara	4. 巻 67
2. 論文標題 Nicotine and tar removed cigarette smoke extract modulates the antigen presentation function of mouse bone marrow derived dendritic cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 264 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13061	査読の有無 無
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 Furuta Kazuyuki, Onishi Hiroka, Ikada Yuki, Masaki Kento, Tanaka Satoshi, Kaito Chikara	4. 巻 299
2. 論文標題 ATP and its metabolite adenosine cooperatively upregulate the antigen-presenting molecules on dendritic cells leading to IFN- production by T cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104587 ~ 104587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.104587	査読の有無 無
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 Inamoto Takuho, Furuta Kazuyuki, Han Cheng, Uneme Mio, Kano Tomonori, Ishikawa Kazuya, Kaito Chikara	4. 巻 290
2. 論文標題 Short chain fatty acids stimulate dendrite elongation in dendritic cells by inhibiting histone deacetylase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 5794 ~ 5810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16945	査読の有無 無
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 Shirakawa Riko, Ishikawa Kazuya, Furuta Kazuyuki, Kaito Chikara	4. 巻 18
2. 論文標題 Knockout of ribosomal protein RpmJ leads to zinc resistance in Escherichia coli	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0277162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0277162	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 Panthee Suresh, Hamamoto Hiroshi, Paudel Atmika, Kaito Chikara, Suzuki Yutaka, Sekimizu Kazuhisa	4. 巻 8
2. 論文標題 Hybrid assembly using long reads resolves repeats and completes the genome sequence of a laboratory strain of Staphylococcus aureus subsp. aureus RN4220	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e11376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e11376	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 Nasu Haruka, Shirakawa Riko, Furuta Kazuyuki, Kaito Chikara	4. 巻 17
2. 論文標題 Knockout of mlaA increases Escherichia coli virulence in a silkworm infection model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0270166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0270166	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 Miyashita Atsushi, Sekimizu Kazuhisa, Kaito Chikara	4. 巻 16
2. 論文標題 Surrounding gas composition affects the calling song development in the two-spotted cricket (<i>Gryllus bimaculatus</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Discoveries and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 204 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2022.01058	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 Ishikawa Kazuya, Shirakawa Riko, Takano Daiki, Kosaki Tomoki, Furuta Kazuyuki, Kaito Chikara	4. 巻 204
2. 論文標題 Knockout of <i>yckB</i> , a Putative Glycosyltransferase, Leads to Reduced Susceptibility to Vancomycin in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00387-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jb.00387-22	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 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石川一也、山口咲季、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 植物環境での生存に関わる大腸菌遺伝子の研究
3. 学会等名 第35回微生物シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 狩野智徳、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 大腸菌のAMP合成酵素PurAの欠損はコリスチン感受性を導く
3. 学会等名 第35回微生物シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白川璃子、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 リボソームタンパク質RpmJの欠損は亜鉛排出トランスポーターをタンパク質レベルで増加させる
3. 学会等名 第76回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白川璃子、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 リボソーム関連遺伝子が欠損した大腸菌は亜鉛排出トランスポーターZntAの増加により亜鉛耐性を示す
3. 学会等名 第76回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口咲季、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 wzxEは植物環境中での大腸菌の生存に必要な遺伝子である
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本凌吾、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 グラム陽性細菌のグリセロ糖脂質の蓄積はダプトマイシン耐性をもたらす
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 狩野智徳、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 大腸菌のアデニロコハク酸合成酵素PurAの欠損は過分極を導くことで抗生物質感受性を変化させる
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 白川璃子、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 リボソームタンパク質RpmJの欠損は大腸菌の垂鉛耐性を導く
3. 学会等名 第16回細菌学若手コロッセウム 札幌市
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚岡武人、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 大腸菌ubiE遺伝子の欠損はプロタミンに対する耐性化を導く
3. 学会等名 第34回微生物シンポジウム（オンライン開催：東京都）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中田希穂、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 大腸菌のtusA欠損は陽イオン性界面活性剤に対する耐性を引き起こす
3. 学会等名 第75回日本細菌学会中国・四国支部総会（オンライン開催：岡山県）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井梨奈、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌RpoBの変異は酸化ストレス感受性化とマクロファージ内での生菌数低下をもたらす
3. 学会等名 第66回日本ブドウ球菌研究会（オンライン開催：東京都）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小崎智己、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 つまようじ由来成分は枯草菌のペリクル形成を促進する
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会シンポジウム 姫路市
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三好裕介、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 枯草菌の酸化ストレス耐性機構の解析
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会シンポジウム 姫路市
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 狩野智徳、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 枯草菌ytpI遺伝子欠損による大腸菌増殖阻害メカニズムの解明
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会シンポジウム 姫路市
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 采女美生、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 細菌の運動性の変化が薬剤効果に及ぼす影響
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会シンポジウム 姫路市
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白川璃子、小崎智己、石川一也、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 リボソームタンパク質の欠損による大腸菌の垂鉛耐性化機構の解析
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会シンポジウム 姫路市
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 垣内力、石川一也
2. 発表標題 モデル植物シロイヌナズナを感染モデルとして利用する試み
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会シンポジウム 姫路市（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川一也、垣内力
2. 発表標題 植物の細菌感染モデル動物としての可能性
3. 学会等名 日本薬学会第143年会シンポジウム 札幌市（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究協力者	古田 和幸 (Furuta Kazuyuki)		
研究協力者	石川 一也 (Ishikawa Kazuya)		

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