

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249009

研究課題名(和文)カイコ感染モデルを利用した宿主 病原体相互作用の理解

研究課題名(英文)Understanding of host-pathogen interaction by using silkworm infection model

研究代表者

関水 和久 (Sekimizu, Kazuhisa)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90126095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,400,000円、(間接経費) 11,220,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において代表者らは、黄色ブドウ球菌の新規病原性因子がRNAの分解制御に働くことを見出した。本病原性因子によって代謝されたRNAは、他のRNA分解酵素による分解に対して耐性を示した。本知見から、RNAの新たな分解調節機構の存在が示唆された。

また、代表者らはカイコの体液タンパク質が黄色ブドウ球菌の病原性を抑制することを見出した。カイコの体液タンパク質は黄色ブドウ球菌の細胞表層に結合し、黄色ブドウ球菌の病原性発現に必要な遺伝子発現を抑制した。本知見は、宿主動物の新しい感染防御機構の存在を明らかにするとともに、黄色ブドウ球菌の新しい環境認識機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that a novel virulence factor of *Staphylococcus aureus* regulates RNA degradation. The virulence factor modified RNA and made RNA insensitive to degradation by RNase. This finding indicates a novel regulatory mechanism of RNA degradation.

This study also revealed that a hemolymph protein of silkworm inhibits virulence of *S. aureus*. The hemolymph protein bound *S. aureus* surfaces and inhibited expression of virulence genes. This finding indicates a novel defense system of host animal against pathogenic bacteria as well as a novel recognition system of *S. aureus* against host environment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：RNAの分解

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、カイコガ幼虫(カイコ)を感染モデル動物として用いる研究を展開してきた。既にこれまで、カイコがヒトに対する多くの病原性細菌や病原性真菌により感染死すること、及び、様々な細菌毒素によりカイコが死亡する事を見いだしている(Kaito et al. 2002, Hossain et al. 2006)。さらに、カイコの菌による感染死が臨床上有効な抗生物質で治癒される事、及び、臨床上有効な抗生物質の体内動態においてヒトとカイコで共通している点がある事を見いだしている(Hamamoto et al. 2004)。これらの結果は、病原性微生物の感染とその薬物による治療のプロセスにおいてヒトとカイコで共通した面があることを示唆している。さらに、研究代表者は黄色ブドウ球菌のカイコ感染モデルを用いて、細菌間で保存された新規の病原性遺伝子 *cvfA*, *cvfB*, *cvfC* を同定することに成功している(Kaito et al. 2005)。*cvfA* 遺伝子はA群連鎖球菌においても病原性に寄与した。また、*cvfA* 遺伝子欠損株の溶血毒素産生量低下を抑圧する遺伝子を検索した結果、新規の転写因子 *SarZ* の同定に成功した(Kaito et al. 2006)。*CvfA* は生物の表現型への寄与が初めて明らかとなった2' 3' サイクリックホスホジエステラーゼである(Nagata et al. 2008)。また、*CvfB* は新規構造のRNA結合タンパク質である(Matsumoto et al. 2010)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、宿主の免疫応答に対抗して細菌が病原性を発現し、増殖してゆく過程の全体像を分子レベルで統合的に理解することにある。本研究では、黄色ブドウ球菌-カイコ感染モデルを用いて、病原性細菌に共通した病原性のシステムを理解する。細菌の病原性発現機構の解明は感染症の克服に役立つばかりでなく、生物学の一般課題である生物間相互作用に関する普遍性の理解にも貢献すると期待される。本研究課題では、研究代表者がこれまでに同定した4つの病原性制御因子以外の新規病原性因子を同定し、それらの機能、及び宿主体内での発現誘導機構を明らかにすることにより、病原性細菌が宿主動物の環境情報を認知し、病原性を発現するシステムの理解を目指す。さらに、トランスジェニックカイコを用いて、細菌の病原性遺伝子の発現に影響を与える宿主因子の機能の解明を試みる。

3. 研究の方法

- (1) カイコ感染モデルを用いた黄色ブドウ球菌の病原性遺伝子の同定
- (2) 新規病原性遺伝子機能についての遺伝学的解析、生化学的解析
- (3) 病原性細菌の宿主体内における病原性

遺伝子の発現制御機構の解析

- (4) 病原性細菌の病原性に影響を与える宿主因子に関する解析

4. 研究成果

(1) 黄色ブドウ球菌の新規病原性因子 *CvfA* の機能解明

CvfA によるRNA 3'末端の環状ジエステル結合分解がRNA分解酵素(PNPase)による分解に対して耐性を導いていることを見出した(図1)。*CvfA* とPNPaseによる拮抗的なRNA分解制御が黄色ブドウ球菌の病原性制御に働いていることが示唆された。

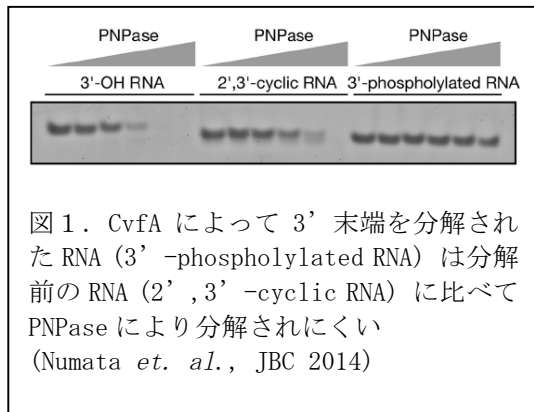


図1. *CvfA* によって3'末端を分解されたRNA(3'-phospholylated RNA)は分解前のRNA(2',3'-cyclic RNA)に比べてPNPaseにより分解されにくい (Numata et al., JBC 2014)

(2) カイコの体液タンパク質の新たな感染防御機能の発見

カイコの体液の脂質輸送タンパク質 Apolipoprotein (ApoLp) が黄色ブドウ球菌の病原性遺伝子の発現を抑制することを見出した。Apolipoproteinの活性を阻害したカイコは黄色ブドウ球菌に対して感受性を示したことから、Apolipoproteinによる細菌の病原性抑制はカイコの感染防御において重要な働きをしていることが示唆された。

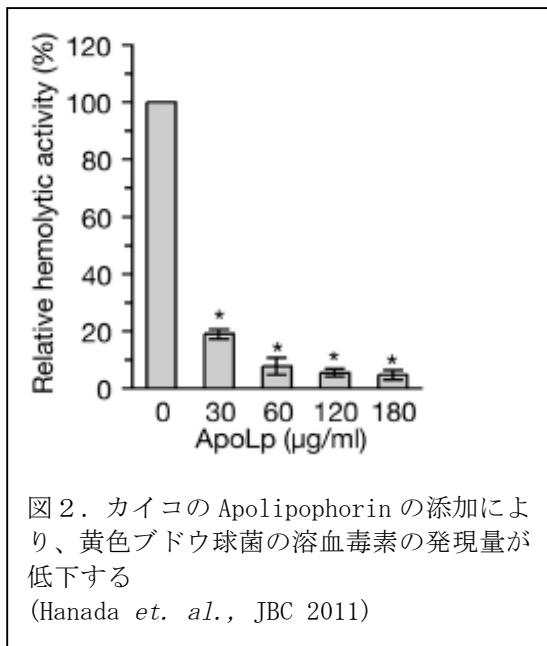
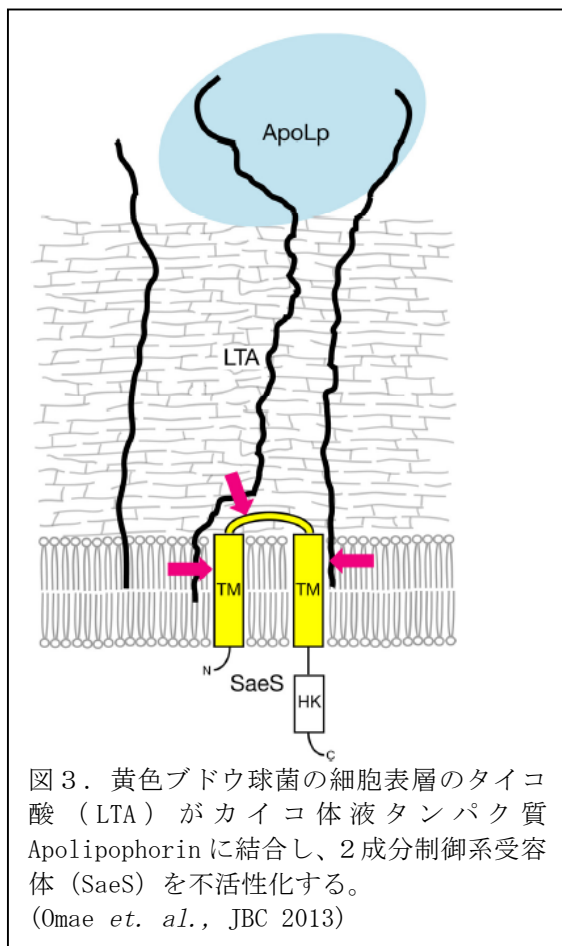


図2. カイコのApolipoproteinの添加により、黄色ブドウ球菌の溶血毒素の発現量が低下する (Hanada et al., JBC 2011)

(3)黄色ブドウ球菌のタイコ酸の環境認知機能の発見

カイコの体液タンパク質 Apolipophorin が黄色ブドウ球菌の細胞表面のタイコ酸に結合することを見出した。さらに、タイコ酸への Apolipophorin の結合は 2 成分制御系の不活性化を導き、病原性遺伝子の発現を抑制した。細胞表面のタイコ酸が宿主の環境認識に働いていることが示唆された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

(1)Miyashita A, Kizaki K, Kawasaki K, Sekimizu K, Kaito C

Primed immune response to Gram-negative peptidoglycans confer infection resistance in silkworms.

J Biol Chem. 289(20):14412-14421. 2014
査読有り

DOI: 10.1074/jbc.M113.525139

(2)Numata S, Nagata M, Mao H, Sekimizu K, Kaito C.

Cvfa protein and polynucleotide phosphorylase act in an opposing manner to regulate *Staphylococcus aureus* virulence.

J Biol Chem. 289: 8420-31. 2014

査読有り

DOI: 10.1074/jbc.M114.554329.

(3)Aoyagi T, Kaito C, Sekimizu K, Omae Y, Saito Y, Mao H, Inomata S, Hatta M, Endo S, Kanamori H, Gu Y, Tokuda K, Yano H, Kitagawa M, Kaku M.

Impact of psm-mec in the mobile genetic element on the clinical characteristics and outcome of SCCmec-II methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Japan.

Clin Microbiol Infect. in press

査読有り

DOI: 10.1111/1469-0691.12575.

(4)Omae Y, Hanada Y, Sekimizu K, Kaito C. Silkmoth apolipophorin protein inhibits hemolysin gene expression of *Staphylococcus aureus* via binding to cell surface lipoteichoic acids.

J Biol Chem. 288: 25542-50. 2013

査読有り

DOI: 10.1074/jbc.M113.495051.

(5)Kaito C, Saito Y, Ikuo M, Omae Y, Mao H, Nagano G, Fujiyuki T, Numata S, Han X, Obata K, Hasegawa S, Yamaguchi H, Inokuchi K, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K.

Mobile genetic element SCCmec-encoded psm-mec RNA suppresses translation of agrA and attenuates MRSA virulence.

PLoS Pathog. 9: e1003269. 2013

査読有り

DOI: 10.1371/journal.ppat.1003269.

(6)Omae, Y., Sekimizu K., and Kaito C. Inhibition of colony-spreading activity of *Staphylococcus aureus* by secretion of delta-hemolysin.

J Biol Chem 287: 15570-15579. 2012

査読有り

DOI: 10.1074/jbc.M112.357848.

(7)Miyazaki, S., Matsumoto, Y., Sekimizu K., and Kaito C. (2012) Evaluation of *Staphylococcus aureus* virulence factors using a silkworm model.

FEMS microbiology letters 326: 116-124 2012

査読有り

DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02439.x.

(8)Miyashita, A., Iyoda, S., Ishii, K., Hamamoto H., Sekimizu K., and Kaito C.

Lipopolysaccharide O-antigen of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for killing both insects and mammals.

FEMS Microbiol Lett **333**: 59-68. 2012
査読有り
DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02599.x.

(9) Quantitative evaluation of cryptococcal pathogenesis and antifungal drugs using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans*.
Matsumoto Y, Miyazaki S, Fukunaga DH, Shimizu K, Kawamoto S, Sekimizu K.
J Appl Microbiol., **112**: 138-46. 2012
査読有り
DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05186.x.

(10) Ueda, T., Kaito C., Omae, Y., and Sekimizu K.
Sugar-responsive gene expression and the agr system are required for colony spreading in *Staphylococcus aureus*.
Microbial pathogenesis **51**: 178-185. 2011
査読有り
DOI: 10.1016/j.micpath.2011.04.003.

(11) Kaito C., Usui, K., Kyuma, T., and Sekimizu K.
Isolation of mammalian pathogenic bacteria using silkworms.
Drug Discovery and Therapeutics **5**: 66-70. 2011
査読有り
DOI: 10.5582/ddt.2011.v5.2.66

(12) Kaito C., Saito, Y., Nagano, G., Ikuo, M., Omae, Y., Hanada, Y., Han, X., Kuwahara-Arai, K., Hishinuma, T., Baba, T., Ito, T., Hiramatsu, K., and Sekimizu K.
Transcription and translation products of the cytolysin gene *psm-mec* on the mobile genetic element *SCCmec* regulate *Staphylococcus aureus* virulence.
PLoS Pathog **7**: e1001267. 2011
査読有り
DOI: 10.1371/journal.ppat.1001267.

(13) Kaito C., Hirano, T., Omae, Y., and Sekimizu K.
Digestion of extracellular DNA is required for giant colony formation of *Staphylococcus aureus*.
Microbial pathogenesis **51**: 142-148. 2011
査読有り
DOI: 10.1016/j.micpath.2011.04.007.

(14) Hanada, Y., Sekimizu K., and Kaito C.
Silkworm apolipoprotein protein inhibits *Staphylococcus aureus* virulence.
J Biol Chem **286**: 39360-39369. 2011
査読有り

DOI: 10.1074/jbc.M111.278416.

[学会発表] (計 34 件)

(1) Structural and biochemical analysis of a virulence regulatory factor CvfB in *Staphylococcus aureus*.
Yasuhiko Matsumoto, Shinya Miyazaki, Chikara Kaito, Kazuhisa Sekimizu.
IUMS 2011 Sapporo The Unlimited World of Microbes, 2011年9月6-11日、北海道

(2) Bacterial Isd system mediated heme utilization is required for *Staphylococcus aureus* virulence in diabetic hosts
Shinya Miyazaki, Yasuhiko Matsumoto, Tohru Sakagami, Chikara Kaito, Kazuhisa Sekimizu.
IUMS 2011 Sapporo The Unlimited World of Microbes, 2011年9月6-11日、北海道

(3) 細菌ならびに真菌の糖尿病宿主における病原性を解析するための無脊椎動物を用いた高血糖感染モデル
宮崎真也、松本靖彦、林陽平、坂上徹、垣内力、龍野桂太、岡崎充宏、奥川周、森屋恭爾、関水久
第94回日本細菌学会関東支部総会、2011年10月21-22日、東京

(4) 高血糖カイク感染モデルを用いた糖尿病宿主に対する感染に必要な細菌の遺伝子の同定
松本靖彦、宮崎真也、坂上徹、山岸徹、大西忠博、垣内力、関水久
感染症若手フォーラム、2012年2月2-4日、長崎

(5) Isd システムを介したヘムの獲得が黄色ブドウ球菌の糖尿病宿主に対する病原性に必要である
宮崎真也、松本靖彦、坂上徹、福永ディミトリ広、林陽平、垣内力、関水久
感染症若手フォーラム、2012年2月2-4日、長崎

(6) Identification of bacterial genes required for virulence in diabetic hosts
Shinya Miyazaki, Yasuhiko Matsumoto, Yohei Hayashi, Tohru Sakagami, Chikara Kaito, Keita Tatsuno, Mitsuhiro Okazaki, Shu Okugawa, Kyoji Moriya, Kazuhisa Sekimizu
第85回日本細菌学会総会、2012年3月27-29日、長崎

(7) 高血糖カイク感染モデルを用いた糖尿病宿主に対する感染に必要な細菌の遺伝子の同定
松本靖彦、宮崎真也、林陽平、坂上徹、石井雅樹、山岸徹、大西忠博、垣内力、関水久

第6回細菌学若手コロッセウム、東京（八王子）、2012年8月8-10日

(8) Isdシステムを介したヘムの獲得が糖尿病宿主に対する黄色ブドウ球菌の病原性に必要である

林陽平、松本靖彦、宮崎真也、坂上徹、石井雅樹、垣内力、関水 和久

第6回細菌学若手コロッセウム、東京（八王子）、2012年8月8-10日

(9) Isd-mediated heme utilization in *Staphylococcus aureus* is required for infection in diabetic hosts

Yasuhiko Matsumoto, Shinya Miyazaki, Yohei Hayashi, Toru Sakagami, Masaki Ishii, Chikara Kaito, and Kazuhisa Sekimizu

第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム、兵庫、2012年9月11-14日

(10) 黄色ブドウ球菌のヘム取り込み機構は、糖尿病状態の宿主に感染するために必要である

松本靖彦、宮崎真也、林陽平、石井雅樹、坂上徹、垣内力、関水 和久

第57回日本ブドウ球菌研究会、東京、2012年9月21-22日

(11) メバロン酸はペプチドグリカン合成のための基質の前駆体として黄色ブドウ球菌の増殖に必要である

安川 淳一郎、松本 靖彦、林 陽平、宮崎 真也、関水 和久

第95回日本細菌学会関東支部会、東京、2012年10月10-12日

(12) 病原性細菌によるカイコ感染モデルを利用した新規抗生物質の探索

関水 和久

東京大学大学院農学生命科学研究科微生物潜在機能探索寄付講座開設記念シンポジウム「微生物機能の多様性」～東京大学のさまざまな部局における微生物研究～、2012年11月28日、東京

(13) 黄色ブドウ球菌のHMG-CoA レダクターゼの活性は基質によるアロステリック制御を受ける

安川淳一郎、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、関水 和久

第85回日本生化学会大会、2012年12月14日～16日、福岡

(14) カイコを用いた真菌感染症研究

Fungal infectious disease research using silkworm, *Bombyx mori*

松本靖彦、上野圭吾、清水公徳、金城雄樹、知花博治、川本進、関水 和久

第86回日本細菌学会総会、千葉、2013年3

月18-20日

(15) カイコ病態モデルを利用した医薬品の探索研究

浜本洋、石川繭子、瀬筒秀樹、坪田拓也、片岡啓子、松本靖彦、垣内力、関水 和久

日本薬学会 第133年会、3月27日～30日、横浜

(16) The role of glucose response system in infection of *Staphylococcus aureus*

石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水 和久

第13回東京大学生命科学シンポジウム、2013年6月8日、東京

(17) 外膜構造の変化により非病原性大腸菌K-12株が高病原化する

吉海周、若松愛、宮下惇嗣、松本靖彦、磯貝隆夫、関水 和久、垣内力

第13回東京大学生命科学シンポジウム、2013年6月8日、東京

(18) 黄色ブドウ球菌のグルコース応答システムの感染における役割

石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水 和久

第7回細菌学若手コロッセウム、2013年8月7-9日、広島

(19) LPS トランスポーターの変異による大腸菌の高病原性化

吉海周、若松愛、宮下惇嗣、松本 靖彦、磯貝隆夫、関水 和久、垣内 力

第86回日本生化学会大会、2013年9月11日～13日、神奈川（横浜）

(20) DUF402 ドメインを有する SA1684 は黄色ブドウ球菌の新規病原性因子である

Han Mao, 齊藤 祐樹, 関水 和久, 垣内 力

第86回日本生化学会大会、2013年9月11日～13日、神奈川（横浜）

(21) 無脊椎動物における適応免疫機構

宮下惇嗣、川崎 清史、関水 和久、垣内 力

第86回日本生化学会大会、2013年9月11日～13日、神奈川（横浜）

(22) rRNA のメチル化による翻訳忠実性の維持が黄色ブドウ球菌の病原性に寄与する

久間 達彦、木村 聡、鈴木 勉、関水 和久、垣内 力

第86回日本生化学会大会、2013年9月11日～13日、神奈川（横浜）

(23) 新規機能性 RNA psm-mec は agrA 遺伝子の翻訳を抑制してメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の病原性を抑制する

幾尾 真理子、齋藤 裕樹、大前 陽輔、毛

瀚, 長野 源太郎, 藤幸 知子, 沼田 俊介, 韓 笑, 小幡 佳津明, 長谷川 節雄, 山口 博樹, 猪口 孝一, 伊藤 輝代, 平松 啓一, 伊藤 孝司, 関水 和久, 垣内 力
第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日
~13 日、神奈川 (横浜)

(24) 黄色ブドウ球菌のグルコース応答システ
ムを介した病原性発揮機構
石井 雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、
坂上徹、垣内力、関水 和久
第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオ
フォーラム 2013、2013 年 9 月 14 日~15 日、
東京

(25) 黄色ブドウ球菌のグルコース応答を介
した病原性調節機構
石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂
上徹、垣内力、関水 和久
第 58 回日本ブドウ球菌研究会、2013 年 9 月
27-28 日、東京

(26) 黄色ブドウ球菌の N-アセチルグルコサ
ミン代謝を介したグルコース応答性の病原
性発揮機構
石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂
上徹、垣内力、関水 和久
第 96 回日本細菌学会関東支部総会、2013 年
10 月 31 日~11 月 1 日、東京

(27) カイコは細菌リポ多糖に対する応答を
増強させ、感染抵抗性を獲得する
宮下 惇嗣、木崎 速人、川崎 清史、関水
和久、垣内 力
第 9 6 回日本細菌学会関東支部総会、2013 年
10 月 31 日~11 月 1 日、東京

(28) 黄色ブドウ球菌に見出された病原性抑
制機構
垣内力、齋藤裕樹、幾尾真理子、大前陽輔、
毛瀚、長野源太郎、藤幸知子、沼田俊介、韓
笑、小幡佳津明、長谷川節雄、山口博樹、猪
口孝一、伊藤輝代、平松啓一、関水 和久
第 3 6 回日本分子生物学会年会、2013 年 12
月 3 日~6 日、神戸

(29) シルクワームによる挑戦
関水 和久
日本動物実験代替法学会第 26 回大会 (ラン
チョンセミナー)、2013 年 12 月 19 日~21 日、
京都

(30) 黄色ブドウ球菌の毒素トランスポー
ターの同定
吉海周、齋藤祐樹、関水 和久、垣内力
2014 年インターラボセミナー、2013 年 1 月
2 5 日、東京

(31) 無脊椎動物を用いた肺炎桿菌感染モデ
ルによる臨床分離株の病原性評価

林陽平、松本靖彦、石井雅樹、龍野桂太、岡
崎充宏、森屋恭爾、関水 和久
2014 年インターラボセミナー、2013 年 1 月
2 5 日、東京

(32) The Mechanism of Glucose-dependent
Virulence in *Staphylococcus aureus*
石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂
上徹、垣内力、関水 和久
第 3 回感染症若手フォーラム、2014 年 2 月
13-15 日、長崎

(33) 黄色ブドウ球菌のコロニー Spre
ading
垣内力、大前陽輔、関水 和久
第 8 7 回日本細菌学会総会 (シンポジウ
ム) 2014 年 3 月 26 日~28 日、東京

(34) 糖尿病宿主に対する黄色ブドウ球菌の
感染におけるグルコース応答機構の役割
石井雅樹、松本靖彦、宮崎真也、坂上徹、垣
内力、関水 和久
第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26-28
日、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
関水 和久 (SEKIMIZU KAZUHISA)
東京大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号: 90126095

(2) 研究分担者
垣内力 (KAITO CHIKARA)
東京大学・大学院薬学系研究科・准教授
研究者番号: 60420238

松本靖彦 (MATSUMOTO YASUHIKO)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号: 60508141

(3) 連携研究者
なし