

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08463

研究課題名(和文)節足動物媒介細菌感染症の感染メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanisms in arthropod-borne bacterial infection

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は野兔病菌(*Francisella tularensis*)の節足動物への定着機構及びヒトへの感染機構を明らかにすることを目的とした。

これらの分子機構を解明するために、マダニおよびカイコ感染モデルを新たに構築した。これらのモデルを利用し、定着や節足動物内での増殖に必須の野兔病菌因子およびヒト細胞への障害性を担う複数の因子を同定した。さらに、ヒトへの感染機構においては、VI型分泌機構のエフェクターであるIglEが細胞内輸送を阻害すること、IglCがユビキチンプロテアソーム系を阻害することを示し、これらのエフェクターがヒト宿主細胞内での増殖を強化していることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated molecular mechanisms of *Francisella tularensis* important for colonization in arthropods and pathogenesis in human cells.

To elucidate these molecular mechanisms, we developed new infection models using tick and silkworm. Using these infection model, we identified several factors of *F. tularensis* important for the colonization and pathogenesis.

In addition, we analyzed the relationship between type VI secretion system (T6SS) of *F. tularensis* and its pathogenesis. We demonstrated T6SS effector IglE inhibited intracellular trafficking of host cells, and that IglC was associated with ubiquitin-proteasome system for its pathogenesis.

研究分野：細菌学

キーワード：野兔病菌 VI型分泌機構 エフェクター マダニ カイコ 野兔病 *Francisella* 細胞内増殖

1. 研究開始当初の背景

節足動物媒介感染症は近年、世界的に発生地域や件数が拡大している。これは近年の地球温暖化の影響による媒介節足動物の生息域や活動期間の変化の影響であると考えられている。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、大きな問題となった。これらの事例は、将来的な節足動物媒介性の新興感染症および再興感染症の発生を強く示唆するものである。

野兔病菌(*Francisella tularensis*)はグラム陰性の短桿菌で、野兔病の病原菌である。野兔病は北米、北アジアからヨーロッパに至る、ほぼ北緯30度以北の北半球に広く発生している。ヒトでは感染部の皮膚潰瘍やペスト様の症状を呈する。未治療の致死率は5%であり、病原性は非常に強い。野兔病菌はウサギとダニ等の吸血性節足動物の間で生活環が保持され、ウサギとの接触や、ダニによる吸血などを介してヒトに感染する。ヒトからヒトへ直接感染した事例はなく、生活環を形成している野生動物と媒介節足動物への暴露が重要な感染経路となっている。

2. 研究の目的

節足動物におけるこれら節足動物媒介性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感染症をコントロールするためには、節足動物媒介による病原性への影響や、節足動物体内を主とした環境中を含む病原体の生活環を詳細に把握することが必須であると考えられる。

本研究ではダニ媒介性の野兔病菌をモデルとして、節足動物を経由することによる病原性への影響、節足動物内での生存戦略を解明することを目的とした。

野兔病菌が安定した生活環を形成するためには、環境中の媒介節足動物の体内で長期間生存可能である能力と、媒介生物が哺乳類(宿主)に接触した際に的確に感染を成立させる能力の両方が必要であると考えられる。しかしながら野兔病菌がどのように節足動物に感染し生存しているのか、節足動物内でのどのように哺乳類(宿主)への感染性・病原性を発現しているのかは全く解明されていない。そこで本研究では次の2項目について研究を行う計画である。

A. 野兔病菌のダニへの定着・生存に重要な因子の同定。

B. 野兔病菌のダニから宿主への移行に重要な因子の同定。

3. 研究の方法

A-1. マダニ-野兔病菌感染モデルの構築

マダニの肛門から野兔病菌を感染させ、その後のマダニ内での動態をreal-time PCRで確認し、マダニ内に野兔病菌が維持されるかどうかを確認する。

A-2. マダニ内での定着に重要な野兔病菌因子の同定

ヒトへの感染状態である37とマダニへの感染状態である25での野兔病菌の発現遺伝子の状態をしらべ、25での発現が上昇している遺伝子を同定する。それらの遺伝子を欠損させた野兔病菌を構築し、マダニへ感染させマダニの定着に重要な遺伝子を同定する。

A-3. カイコモデルの構築

マダニの代替昆虫としてカイコを使用し、感染モデルを構築する。カイコに野兔病菌を感染させ、その動態をPCRおよび菌数測定で観察する。既存の病原因子の欠損株を感染させ、感染モデルとしての評価を行う。

A-4. 新規の昆虫定着因子の同定

野兔病菌にトランスポゾンでランダムに変異を入れた株(1000株)のライブラリを作成する。マダニやカイコに感染させ、マダニやカイコに定着しないものをスクリーニングし、その責任遺伝子を同定する。

B-1. VI型分泌機構の機能解析

野兔病菌のVI型分泌機構およびそのエフェクターをコードするFrancisella Pathogenic Island (FPI)上の遺伝子を宿主細胞に発現させ、その機能を推定する。またそれぞれの欠損株を作成し、ヒト細胞内での増殖に対する作用を検討する。

B-2. 新規病原因子の探索

野兔病菌にトランスポゾンでランダムに変異を入れた株(1000株)のライブラリを作成する。ヒト培養細胞に感染させ、細胞内増殖や細胞毒性の減弱した株をスクリーニングし、その責任遺伝子を同定する。

4. 研究成果

A-1, 2. マダニ-野兔病菌感染モデルの構築と定着因子の同定

日本で採取されたマダニから野兔病菌の検出をReal-time PCRで行った。その結果、*Ixodes ovatus*, *I. persulcatus*, *I. monospinosus*から野兔病菌のDNAが検出された。*I. persulcatus*に野兔病菌(*F. tularensis* subsp. *holarctica* [*F. holarctica*] LVS)を経肛門感染したところ、数週間にわたってマダニの体内で野兔病菌が維持された。25での発現が高い遺伝子を欠損した株をマダニに感染させたところ、1

型分泌機構を構成する *hlyD* 遺伝子の欠損株でマダニ体内での増殖が抑制されていた。このことからマダニは野兔病菌のキャリアモデルとして有用であり、I 型分泌機構がマダニへの定着に重要であることが示唆された。

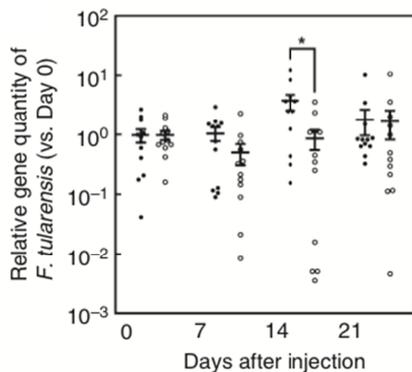


図 1. *F. holarctica* LVS の *I. persulcatus* 内での DNA 量。数週間の維持が観察された。また、*hlyD* 遺伝子の欠損株では day 14 において菌数の減少が観察された。

A-3. カイコモデルの構築

マダニはライフサイクルが長く、小さいことから取扱いが難しく、個体差も大きいことから、より簡便な昆虫モデルが必要となった。そこでカイコ (*Bombyx mori*) を使用した昆虫感染モデルの構築を試みた。カイコに野兔病菌 *F. holarctica* を感染させた場合、菌はカイコの免疫を抑制し、定着することが明らかとなった。このことからカイコ-*F. holarctica* は昆虫への定着モデルとして使用できることが示唆された。

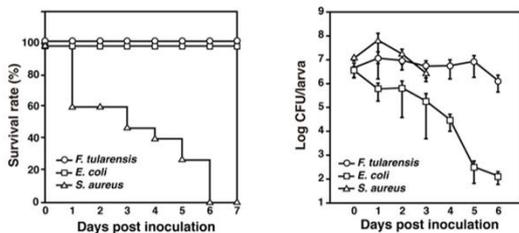


図 2. *F. holarctica* LVS のカイコに対する病原性および体内菌数。*F. holarctica* LVS はカイコに病原性を示さず、体内菌数は維持された。

また、*F. tularensis* subsp. *novicida* (*F. novicida*) を感染させた場合はカイコに病原性を示すことが明らかとなった。また *F. novicida* のヒトへの病原性に関与する遺伝子を欠損させた株ではカイコへの病原性は減弱した。このことからカイコ-*F. novicida* は病原性因子の探索に有用であることが示唆された。

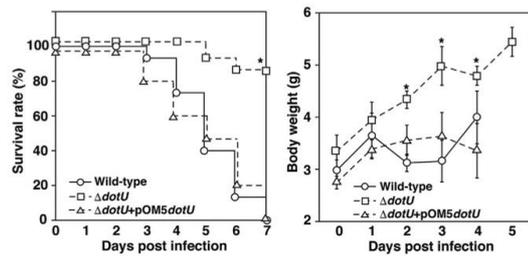


図 3. *F. novicida* のカイコに対する病原性および体内菌数。*F. novicida* はカイコに病原性を示し、体内菌数の増加が観察された。

A-4. 新規の昆虫定着因子の同定

現在、カイコに *F. novicida* のトランスポゾン変異ライブラリを感染させ、病原性を示さなくなる株を選定し、責任遺伝子を同定している。現在 8 株のスクリーニングと遺伝子同定が完了している。

B-1. VI 型分泌機構の機能解析

VI 型分泌機構およびそのエフェクターをコードする領域である FPI 上のタンパク質を 293T 細胞に発現させ、その局在を調べた。その結果、IgE が中心体に局在することが明らかとなった。また、Pull-down assay により IgE は チューブリンと結合することが明らかとなった。*igLE* 欠損株を細胞に感染させると細胞内増殖は減弱していた。また菌は中心体の周りに輸送され、そこでリソソームと融合していた。また、IgE の発現はダイニンを介した輸送を阻害した。このことから IgE は中心体に作用し、細胞内の輸送を阻害することにより菌の細胞内増殖に有利に働くことが示唆された。

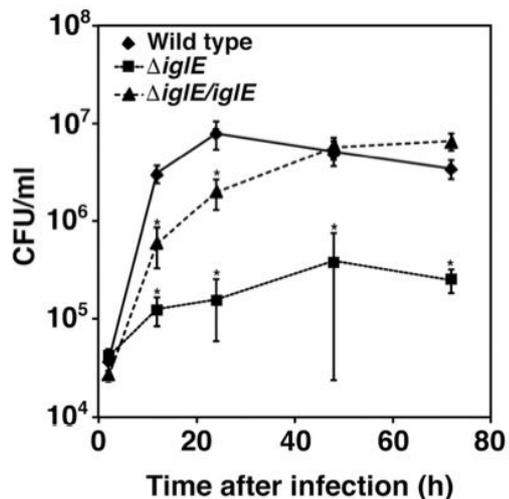


図 4. *F. novicida* の細胞内増殖に与える IgE の影響。*igLE* の欠損株では THP-1 細胞での細胞内増殖が抑制される。

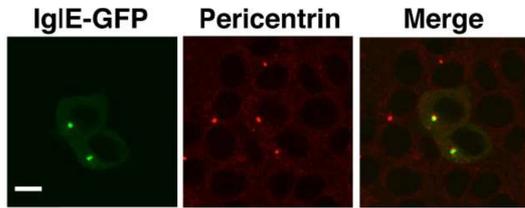


図 5. IgE の局在。293T 細胞に IgE を発現させると中心体マーカーである Pericentrin と共局在する。

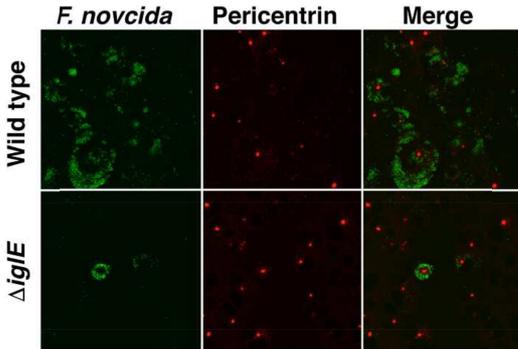


図 6. *F. novicida* の細胞内動態に与える IgE の影響。*F. novicida* は THP-1 細胞の細胞質内で増殖するが、*iglE* 欠損株では菌は中心体近傍に輸送され、集積する。

また、FPI にコードされるタンパク質の 1 つである *IgIC* はユビキチンプロテアソーム系などに作用するシャペロンである HSC70 に結合することが明らかとなった。*iglC* 欠損株では細胞内増殖が減弱するが、ユビキチンプロテアソーム系の阻害剤を作用させると *iglC* 欠損株の細胞内増殖が回復した。このことから *IgIC* はユビキチンプロテアソーム系に作用し、細胞内増殖を制御している可能性が示唆された。これらのデータは現在投稿中である。

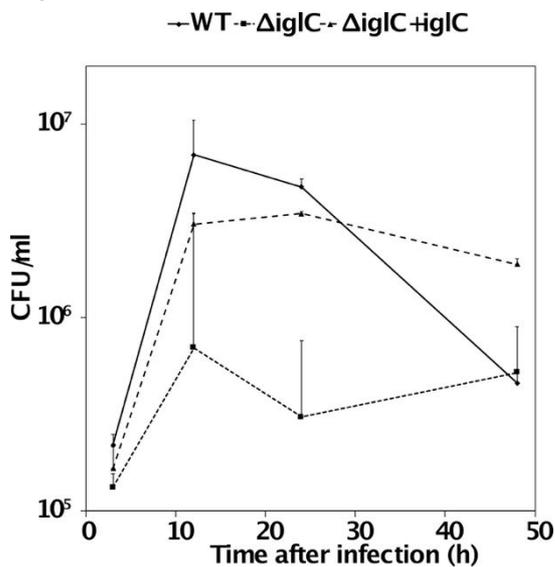


図 7. *F. novicida* の細胞内増殖に与える *IgIC* の影響。*iglE* の欠損株では THP-1 細胞における細胞内増殖が抑制される。

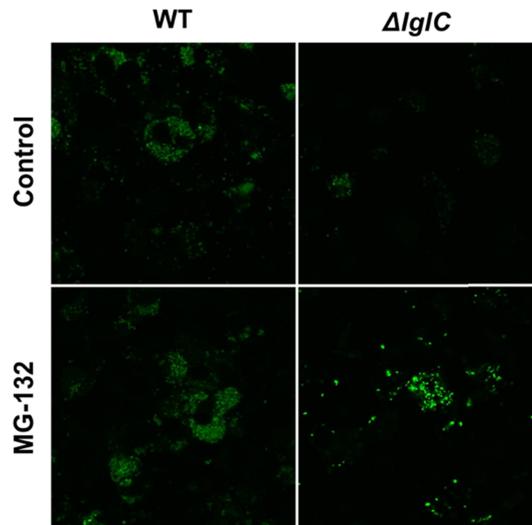


図 8. *F. novicida* の細胞内動態に与えるユビキチンプロテアソーム阻害剤の影響。*F. novicida* は THP-1 細胞の細胞質内で増殖するが、*iglC* 欠損株では増殖が見られない。ユビキチンプロテアソーム阻害剤の MG-132 処理細胞では *iglC* 欠損株の増殖が一部回復する。

B-2. 新規病原因子の探索

野兎病菌を細胞に感染させると細胞が障害を受ける。*F. novicida* のトランスポゾン変異株ライブラリを細胞に感染させ、細胞傷害性を示さない株をスクリーニングした。1000 株中 5 株が細胞傷害性を示さないことが明らかとなった。これらの変異体からトランスポゾン部位を回収し、周辺の塩基配列を解析し、変異遺伝子を同定した。

また、結果 A-4 で同定したカイコに対する病原性責任遺伝子の欠損株をヒト由来宿主細胞に感染させ、ヒトでの病原性への関与を検討している。

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 4 件)

1. Expression of Francisella FPI protein *IgE* in mammalian cells is involved in intracellular trafficking, possibly through MTOC.

Shimizu T, Otonari S, Suzuki J, Uda A, Watanabe K, Watarai M.

Microbiologyopen. Accepted. 査読有り

2. Silkworm model for Francisella novicida infection.

Saha SS, Suzuki J, Uda A, Watanabe K, Shimizu T, Watarai M.

Microb Pathog. 2017 Dec;113:94-101. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.036. 査読有り

3. Contribution of methionine sulfoxide reductase B (MsrB) to Francisella tularensis infection in mice.
Saha SS, Hashino M, Suzuki J, Uda A, Watanabe K, Shimizu T, Watarai M.
FEMS Microbiol Lett. 2017 Jan;364(2). pii: fnw260. doi: 10.1093/femsle/fnw260. 査読有り

4. Symbiosis with Francisella tularensis provides resistance to pathogens in the silkworm.
Suzuki J, Uda A, Watanabe K, Shimizu T, Watarai M.
Sci Rep. 2016 Aug 10;6:31476. doi: 10.1038/srep31476. 査読有り

5. Detection of Francisella tularensis and analysis of bacterial growth in ticks in Japan.
Suzuki J, Hashino M, Matsumoto S, Takano A, Kawabata H, Takada N, Andoh M, Oikawa Y, Kajita H, Uda A, Watanabe K, Shimizu T, Watarai M.
Lett Appl Microbiol. 2016 Oct;63(4):240-6. doi: 10.1111/lam.12616. 査読有り

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 野兔病菌エフェクターIgICの解析
清水 隆、渡邊健太、宇田晶彦、度会雅久
第 91 回日本細菌学会総会
2018 年 03 月

2. 膜輸送を阻害する野兔病菌エフェクターの解析
清水 隆、渡邊健太、宇田晶彦、度会雅久
第 160 回日本獣医学会学術集会
2017 年 09 月

3. 中心体に作用する野兔病菌エフェクターの解析
清水 隆、鈴木 尋、渡邊健太、宇田晶彦、度会雅久
第 90 回日本細菌学会総会
2017 年 03 月

4. VI 型分泌機構をコードする Francisella パソジェニックアイランドの解析
清水 隆、渡邊健太、宇田晶彦、度会雅久
第 89 回日本細菌学会総会
2016 年 03 月

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ：
<https://yu-vph.jimdofree.com>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
高野 愛 (Takano Ai)
山口大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号：90700055

(4)研究協力者
なし