

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22523

研究課題名(和文) in vivo実験的進化系を利用した細菌の病原性システムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of bacterial virulence systems using in vivo experimental evolutionary systems

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)：地球上においては、多細胞生物の出現以降に、環境細菌が多細胞生物の体内環境に様々な遺伝子群の機能を適応進化させ、常在細菌や病原性細菌に進化したと考えられる。しかしながら、病原性細菌と非病原性細菌の違いを導く分子機構は未だほとんど理解されていない。本研究では、カイコ感染モデルを活用して、非病原性細菌が自身の遺伝子に変異を蓄積させ、宿主免疫系から排除されない状態や宿主免疫系を凌駕する状態を構築して行く過程を実験的に捉えた。分離された大腸菌変異株を解析することにより、病原性上昇を引き起こす大腸菌の遺伝子変異として、LPSトランスポーターのアミノ酸置換変異とペリプラズムグルカン合成酵素の欠損を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、カイコ感染モデルを利用して非病原性細菌から病原性細菌への進化プロセスを捉えることに成功した。さらに、病原性上昇を引き起こす細菌の遺伝子変異を2種類同定した。これらの研究成果は、病原性細菌の進化プロセスを研究する新たな方法論を確立した点、ならびに、細菌の感染能力獲得の新たな分子メカニズムを明らかにした点で学術的意義がある。また、高病原性化を引き起こす遺伝子変異の検出は高病原性の細菌変異株を検出する新たな技術につながり、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：On Earth, since the emergence of multicellular organisms, environmental bacteria are thought to have evolved into commensal and pathogenic bacteria by adapting and evolving the functions of various genes to the internal environment of multicellular organisms, but the molecular mechanisms leading to the differences between pathogenic and nonpathogenic bacteria remain largely unexplored. In this study, using a silkworm infection model, we experimentally captured the process by which nonpathogenic bacteria accumulate mutations in their own genes and develop a state in which they are not eliminated by the host immune system or outperform the host immune system. By analyzing *E. coli* mutant isolates, we found amino acid substitution mutations in the LPS transporter and gene disruptions in periplasmic synthase that cause increased virulence.

研究分野：分子生物学, 生化学, 微生物学

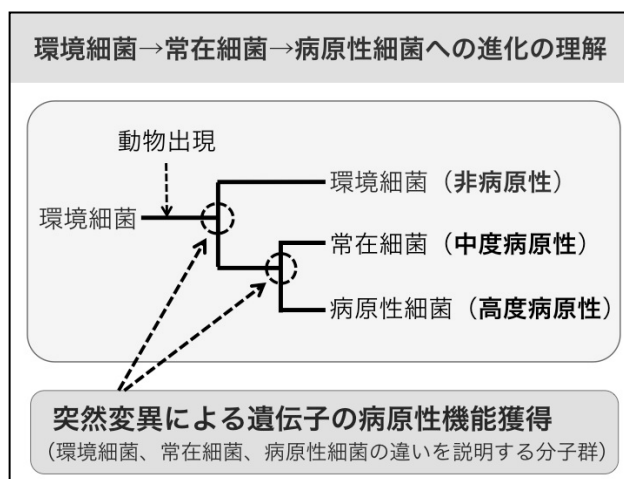
キーワード：実験的進化 LPSトランスポーター ペリプラズムグルカン

### 1. 研究開始当初の背景

代表者は現在までに細菌の病原性評価系としてカイコ感染モデルを独自に確立し、その活用により、細菌の機能未知因子群の中から新規病原性調節因子群を同定してきた。その結果、多くの新規病原性調節因子が、病原性細菌だけでなく、非病原性細菌にも保存されていることを発見した。この結果から、代表者は病原性細菌に特有の遺伝子群だけでなく、非病原性細菌と病原性細菌が共通に保有する遺伝子も対象として、細菌の病原性発現機構を理解して行く必要があると考えた。実際に地球上における多細胞生物の出現は細菌の出現よりも後期であることから、地球上に最初に存在した細菌は非病原性細菌であり、多細胞生物出現後に非病原性細菌から病原性細菌への進化が起きたと推定できる。そこで代表者は、非病原性細菌から病原性細菌への進化プロセスを実験的に模倣すれば、非病原性細菌が持つ全ての遺伝子群を元にして、細菌の病原性が成立する分子基盤を明らかにできるという構想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、病原性細菌と非病原性細菌の2つの細菌グループ間の違いを生み出す分子群を構成的に理解することである。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いる。病原性細菌と非病原性細菌の違いを導く分子機構は未だほとんど理解されていない。地球上においては、多細胞生物の出現以降に、環境細菌が多細胞生物の体内環境に様々な遺伝子群の機能を適応進化させ、常在細菌や病原性細菌に進化したと考えられる(右図)。代表者は、カイコを使った感染モデル系を独自に確立することで、多数の細菌株の動物個体に対する殺傷活性を定量的かつ簡便に評価することに成功している。本研究では、カイコ感染モデルを活用して、非病原性細菌が自身の遺伝子に変異を蓄積させ、宿主免疫系から排除されない状態や宿主免疫系を凌駕する状態を構築して行く過程を実験的に捉える。高病原性化した細菌変異株のゲノム情報から、細菌の宿主環境への適応と進化を引き起こす分子群の総体を構成的に理解する。



### 3. 研究の方法

- (1) 高病原性の細菌変異株の取得: カイコに対して病原性が弱い細菌種(大腸菌, 枯草菌, 表皮ブドウ球菌, ラクチス菌)を変異原により処理し、カイコに繰り返し体液感染させることにより、カイコに対して病原性が上昇した細菌変異株を作出する。マウス感染実験を行い、宿主動物に対する普遍性を検討する。
- (2) 高病原性の原因となる遺伝子変異の同定: 高病原性の細菌変異株の全ゲノム配列を決定し、遺伝子変異群を同定する。遺伝子変異の中から、病原性上昇の原因となる変異を遺伝学的手法(ファージによる形質導入)により同定する。
- (3) 病原性上昇の分子メカニズムの解明: 宿主動物との複数の相互作用プロセス(宿主細胞の傷害活性, 宿主免疫機構からの防御能, 宿主細胞への接着・侵入能, 宿主免疫の過剰活性化)について、高病原性の変異株と親株の違いを特定する。さらに、細菌分子群の発現変化を網羅的解析(RNA シークエンス解析, タンパク質 2D-MS 解析)により解明する。
- (4) 細菌間で共通した病原性上昇システムの解明: 異なる細菌種の間で、病原性上昇を引き起こす遺伝子変異群と細菌分子群を比較解析し、細菌種間で共通の遺伝子変異群と細菌分子群をネットワークとして把握する。遺伝子変異群をセットとして用いて、モデル細菌(大腸菌, 枯草菌)を遺伝子改変し、病原性細菌を創成できるか検討する。
- (5) 現存の病原性細菌の病原性システムの解明: 病原性上昇を導く遺伝子変異群が、現存の病原性細菌(黄色ブドウ球菌, コレラ菌など)において見出されるかゲノムデータベースを用いて検討する。遺伝学的手法により、遺伝子変異が病原性発現の原因か検証する。

### 4. 研究成果

(1) LPS トランスポーターのアミノ酸置換変異による大腸菌の高病原性化

非病原性の大腸菌実験室株をカイコに繰り返し感染させることにより、ゲノムの変化に伴って細菌の病原性が上昇して行く過程を捉えた。21 回の変異原処理とカイコに対する感染により親株に比べて 500 倍の病原性を示す大腸菌変異株を得ることに成功した (図 1)。全ゲノム配列を決定した結果、病原性上昇の原因の一つとして LPS トランスポーターのアミノ酸置換変異を同定した。LPS トランスポーターは内膜で合成された LPS を外膜へ輸送する輸送体であり、大腸菌の増殖に必須である。本研究で分離された LPS トランスポーター変異株の栄養培地中での増殖速度は親株と変わらなかった。LPS トランスポーター変異株は膜小胞と共に異物を菌体外に排出する能力を上昇させ、様々な抗生物質と宿主免疫系の抗菌ペプチドに対する耐性を上昇していた。さらに臨床分離された病原性大腸菌において、LPS トランスポーターのアミノ酸置換変異が見出され、それらは抗生物質と抗菌ペプチドに対する大腸菌の耐性を導いた。以上の知見は、*in vivo* モデルにおいて細菌の病原性機能を実験的に進化させた初めての知見であり、増殖必須因子である LPS トランスポーターの変異が宿主免疫系の抗生物質に対する大腸菌の耐性を上昇させることを示唆している。

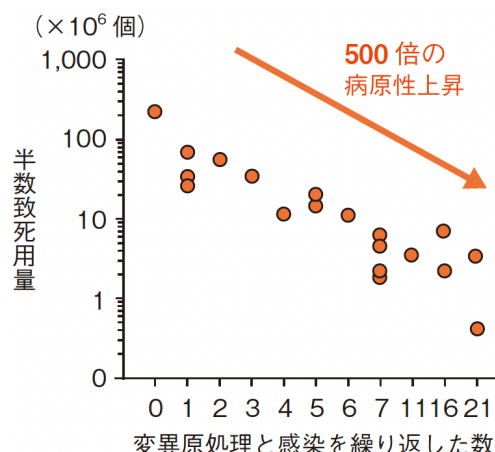


図 1. 実験的進化による大腸菌の高病原性化

大腸菌の実験室株を用いて、変異原処理とカイコへの感染を繰り返した。感染死したカイコから分離された大腸菌について、カイコに対する殺傷活性を求めた。縦軸はカイコに対する半数致死容量で、値が小さいほど病原性が高いことを示す。

(PLoS pathogens 23;16(4):e1008469. 2020)

(2) ペリプラズムグルカン合成酵素の欠損による大腸菌の高病原性化

LPS トランスポーター以外の大腸菌の高病原性化をもたらす遺伝子変異を同定する目的で、カイコ感染モデルを用いた大腸菌の実験的進化を行った。1 回の変異原処理と感染実験により、16 株の高病原性大腸菌変異株を得た。16 株のうち 6 株には、病原性上昇をもたらす LPS トランスポーターのアミノ酸置換変異が存在した。LPS トランスポーターに変異を持たない 10 株の全ゲノム解析を行ったところ、これらの大腸菌変異株はすべて、*opgG* 遺伝子または *opgH* 遺伝子に、終止コドン変異またはアミノ酸置換変異を有していた。*opgG* 遺伝子と *opgH* 遺伝子はオペロンを構成し、大腸菌のペリプラズム層のグルカン合成酵素をコードする。*opgG* 遺伝子と *opgH* 遺伝子の欠損がカイコに対する大腸菌の高病原性化を導くと考え、*opgG* 欠損株と *opgH* 欠損株のカイコに対する殺傷活性を検討した。その結果、*opgG* 欠損株と *opgH* 欠損株はいずれも親株に比べてカイコに対する殺傷活性が増大していることが明らかとなった。

*opgG* 欠損株と *opgH* 欠損株がカイコに対する殺傷活性を上昇する原因を知る目的で、カイコの免疫反応を担う抗菌ペプチドに対する感受性を検討した。その結果、*opgG* 欠損株と *opgH* 欠損株は、親株に比べて抗菌ペプチドに対する耐性を示すことが明らかとなった。さらに、他の抗生物質に対する耐性を検討したところ、*opgG* 欠損株と *opgH* 欠損株は抗生物質であるバンコマイシンとレボフロキサシンに対して耐性を示すことが明らかとなった (図 2)。

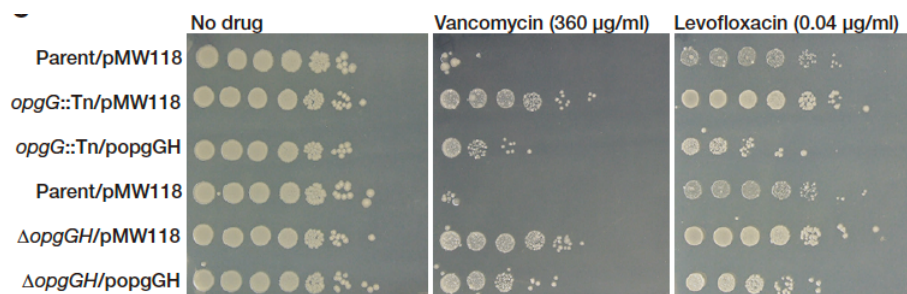


図 2. *opgG* 欠損株の抗生物質に対する耐性化

*opgG* 欠損株 (*opgG::Tn*)、および *opgGH* 欠損株 ( $\Delta$  *opgGH*) の一晚培養液を希釈し、バンコマイシンおよびレボフロキサシンを含有する寒天培地にスポット後、一晚培養した結果を示す。

(J. Bacteriol. 203(12):e0051520. 2021)

以上の結果は、ペリプラズムグルカン合成酵素遺伝子 *opgG* と *opgH* の欠損が大腸菌の抗生物質に対する耐性を導き、大腸菌の病原性を上昇させることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Murakami K, Nasu H, Fujiwara T, Takatsu N, Yoshida N, Furuta K, Kaito C.	4. 巻 203(12)
2. 論文標題 The absence of osmoregulated periplasmic glucan confers antimicrobial resistance and increases virulence in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Bacteriol.	6. 最初と最後の頁 e0051520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00515-20	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 Kaito C, Murakami K, Imai L, Furuta K.	4. 巻 64(9)
2. 論文標題 Animal infection models using non-mammals.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 585-592
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12834.	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 Kaito C, Yoshikai H, Wakamatsu A, Miyashita A, Matsumoto Y, Fujiyuki T, Kato M, Ogura Y, Hayashi T, Isogai T, Sekimizu K.	4. 巻 16(4)
2. 論文標題 Non-pathogenic <i>Escherichia coli</i> acquires virulence by mutating a growth-essential LPS transporter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1008469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1008469.	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7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 那須遥、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 mIaA遺伝子欠損による大腸菌の病原性上昇メカニズムの解析
3. 学会等名 第62回日本生化学会 中国・四国支部例会（オンライン開催：岡山県）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垣内力
2. 発表標題 病原体進化の要因となる病原体宿主相互作用
3. 学会等名 第94回日本生化学大会 シンポジウム（オンライン開催）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野大輝、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 新規糖転移酵素の欠損が枯草菌の病原性上昇を導く
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中国・四国支部総会（オンライン開催：広島県）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野大輝、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 ykcB遺伝子の欠損が枯草菌の病原性上昇を導く
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会 選抜ワークショップ（オンライン開催：東京都）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 垣内力
2. 発表標題 進化実験により細菌の病原性を理解する
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上千代、那須遥、藤原巧海、高津奈央、古田和幸、垣内力
2. 発表標題 ペリプラズムグルカン合成酵素の欠損による大腸菌の高病原性化メカニズムの解析
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垣内力
2. 発表標題 in vivo実験的進化系を利用した細菌の病原性システムの解明
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 垣内力（分担執筆）（編集：嘉糠 洋陸）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 211
3. 書名 パンデミック時代の感染症研究（執筆項目：進化実験による細菌病原性の理解）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大腸菌が遺伝子変異により病原性を獲得する過程を明らかに～病原性細菌の進化をとらえる～  <a href="https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id711.html">https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id711.html</a></p>
--

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