

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570160

研究課題名(和文) 宿主感染時の病原性にかかわる細菌遺伝子発現制御と細胞貪食機構の解析

研究課題名(英文) Mechanisms for regulation of bacterial gene to express pathogenicity and escape phagocytic killing in host

研究代表者

白土 明子 (Shiratsuchi, Akiko)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：90303297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：感染状態の宿主と細菌は相互に感知し、遺伝子発現を変化させる。そして、感染時の細菌で発現変動する遺伝子の中には、宿主環境への適応と宿主との共存に働く種類が存在すると考えられる。本研究により、ショウジョウバエマクロファージによる細菌貪食を担う受容体と細胞壁成分が同定され、細胞壁成分の減少により細菌は貪食を逃れて感染を続けることがわかった。また、貪食された大腸菌で発現亢進する遺伝子の解析から、RNA合成酵素のシグマ因子や二成分遺伝子発現制御系因子が見出され、これらの中に宿主傷害性や感染持続に働く種類が含まれることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In infectious conditions, both host and bacteria sense each other and alter gene expression. We hypothesized that bacteria change gene transcription pattern to adapt to environmental changes and coexist with host. In this study, we found that lack of bacterial cell wall components induced persistence of bacterial infection by inhibition of phagocytosis by *Drosophila* macrophages. We observed enhanced expression of bacteria genes coding the sigma factors, a type of subunit of RNA polymerase, and factors of the two-component gene expression regulatory system upon bacterial phagocytosis by macrophages. We characterized these factors in influence of bacterial pathogenicity and found that some of them acted for inhibition of bacterial virulence and persistence in the host.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物学

キーワード：細胞貪食 自然免疫 感染症 微生物 マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

生体内に細菌が侵入すると、宿主はこれを感知し、液性または細胞性免疫応答を発動して、細菌を排除しようとする。一方で、細菌側も宿主内で排除されずに感染を続けるよう、宿主環境や免疫因子を感知して、遺伝子発現を変化させているはずである。感染時の免疫応答に関するこれまでの研究は、宿主免疫分子に関して集中的な解析が行われてきた。また、細菌側の解析では、主に実験的環境で培養された細菌が材料とされることが多かった。そのため、宿主と細菌の両者に遺伝学が適用できる *in vivo* モデル感染系を用いることで、感染状態の宿主および細菌の振る舞いを明らかにできると考えた。

## 2. 研究の目的

上述の背景に基づき、食細胞による細菌貪食機構とその細菌因子による調節、宿主内で活性化する細菌遺伝子の同定と発現制御の調節、そしてこれらの細菌因子の宿主感染維持や宿主への傷害性への働きを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

自然免疫の基本機構は線虫からヒトに至るまで進化的に高度に保存されている。特に、食細胞による貪食排除機構の標的には、細菌に限らずアポトーシス細胞やがん細胞などの自己変性細胞も含まれ、これらを認識して排除する分子機構も進化的な保存性が高い。本研究では、ヒトと同じ免疫基本機構と専門食細胞を持ち、遺伝学の使えるモデル動物として、キロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を宿主に用いた。また、細菌には、遺伝学が利用できリソースの整ったグラム陽性細菌の黄色ブドウ球菌と、グラム陰性細菌の大腸菌を用いた。

ショウジョウバエの腹に菌株を注入する体腔感染モデルにより宿主傷害性や持続感染の程度を評価した。また、体液から取り出した食細胞やショウジョウバエ食細胞株を用いて、貪食反応を *in vitro* 解析した。一方、ショウジョウバエの液性抗菌物質や、細菌の免疫回避性因子の発現レベルは、抗菌ペプチドや細菌因子の mRNA レベルを定量的 PCR により測定することで評価した。

## 4. 研究成果

### 4-1: 細菌細胞表面因子による宿主貪食反応からの回避機構の解析

黄色ブドウ球菌の細胞壁成分関連遺伝子の欠損菌株を用いて、宿主感染時の傷害性低下と、ショウジョウバエ食細胞による被貪食能が低下する株を探した。この性質を持つと見出された株の変異遺伝子には、ペプチドグリカン合成に必要な遺伝子群が含まれていたことから、黄色ブドウ球菌のペプチドグリカンが食細胞に認識されることで、細菌の貪食排除が行われると考えられた。つづいて、

食細胞の貪食受容体群の中から、この反応に関わる種類を調べたところ、インテグリンが黄色ブドウ球菌のペプチドグリカンをリガンドとする貪食に必要であることがわかった。インテグリンはショウジョウバエアポトーシス細胞の貪食も担い、しかし自己由来のアポトーシス細胞に細菌型ペプチドグリカンは存在しないと考えられる。そのため、インテグリンは自然免疫による細胞貪食を担うマルチリガンド性の受容体であると示された。

### 4-2: 自然免疫としての細胞貪食受容体のマルチリガンド性

ショウジョウバエ食細胞の貪食受容体として、Draper とインテグリンが報告されている。これまでに、Draper はアポトーシス細胞表面に出現する小胞体タンパク質プレタポルテ、および黄色ブドウ球菌のリポタイコ酸とそれぞれ結合して貪食反応を誘導すると示されている。今回、小胞体タンパク質の CaBP1 もアポトーシス細胞の貪食リガンドになるとわかり、その受容体は Draper であることがショウジョウバエの遺伝学的実験と、生化学的な実験とから判明した。本研究により、Draper はアポトーシス細胞のプレタポルテ、CaBP1、そして細菌リポタイコ酸をリガンドとするとわかった。そして、アポトーシス細胞と細菌とは共通の機構、すなわち Draper とインテグリンの2つの受容体による認識と貪食排除を受けるとわかった。

### 4-3: 宿主感染時に発現亢進するシグマ因子の解析

大腸菌の体腔注入を受けたショウジョウバエの組織粗抽出液を調製し、大腸菌のシグマ因子群の発現レベルをウエスタンブロットで解析した。大腸菌が有する7種類のシグマ因子のうち、少なくともシグマ 38 が感染に伴って発現亢進するとわかった。つづいて、シグマ 38 欠損菌株を用いた感染実験を行うと、シグマ 38 は宿主傷害性と感染持続の両者に必要とわかった。シグマ因子は RNA 合成酵素のサブユニットのひとつであり、プロモーター配列と結合して発現する遺伝子を規定する。そこで、シグマ 38 の制御下遺伝子群の変異菌株群を利用して、上述した働きを担う実行因子を探した。その結果、細菌カタラーゼの KatE、KatG が宿主食細胞による貪食時に発現亢進し、食細胞の活性酸素による殺菌を逃れることにより、宿主傷害性や感染維持に働くことがわかった。

### 4-4: 宿主感染時に高度に発現する二成分遺伝子発現制御系因子の解析

二成分遺伝子発現制御系とは、細菌細胞膜の受容体と細胞内の転写因子の組み合わせで成る細菌の情報経路である。宿主感染時にはいずれかの受容体が宿主因子を感知して細菌の生理状態を変化させると考えら

れる。そこで、この系の構成因子群について、宿主感染時の遺伝子プロモーター活性や発現レベルを解析した。そして、膜受容体 EnvZ と転写因子 OmpR の組み合わせで構成される情報経路が宿主感染時に高レベルを示すことがわかった。そこで、両遺伝子の欠損菌株を用いて宿主感染時の宿主傷害性や持続感染性を調べたところ、EnvZ-OmpR は宿主傷害性と感染維持の両者に抑制的に働くことがわかった。これらの働きに抗菌ペプチド産生を導く Imd 経路は関係なかったことから、EnvZ-OmpR は Imd 経路と関連しない仕組みで大腸菌の感染維持や宿主傷害性を調節すると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

- 1 Akiko Shiratsuchi, Naoto Shimamoto, Tran Quoc Tran, Mao Nitta, Afwa Firdausi, Mitsuko Gawasawa, Kaneyoshi Yamamoto, Akira Ishihama, and Yoshinobu Nakankshi. Role of  $\sigma 38$  in prolonged survival of *Escherichia coli* in *Drosophila melanogaster*. *J. Immunol.* 192, 666-675 (2014) (査読有) doi:10.4079/jimmunol.1300968
- 2 Pattaporn Pukklay, Yoshinobu Nakanishi, Mao Nitta, Kaneyoshi Yamamoto, Akira Ishihama, and Akiko Shiratsuchi. Involvement of EnvZ-OmpR two-component system in virulence control of *Escherichia coli* in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438, 306-311 (2013) (査読有) doi:10.1016/j.bbrc.2013.07.062
- 3 Akiko Shiratsuchi, Yoichi Osada, and Yoshinobu Nakankshi. Differences in the mode of phagocytosis of bacteria between macrophages and testicular Sertoli cells. *Drug Discov. Ther.* 7, 73-77 (2013) (査読有) doi:10.5582/ddt.2013.v7.2.73
- 4 Saori Nonaka, Kaz Nagaosa, Toshinobu Mori, Akiko Shiratsuchi, and Yoshinobu Nakanishi. Y.Integrin  $\alpha PS3/\beta v$ -mediated phagocytosis of apoptotic cells and bacteria in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 288, 10374-10380 (2013) (査読有) doi:10.1074/jbc.M112.451427
- 5 Yu Fujita, Kaz Nagaosa, Akiko Shiratsuchi, and Yoshinobu Nakanishi. Role of NPxY motif in Draper-mediated apoptotic cell clearance in *Drosophila*. *Drug Discov. Ther.* 6, 291-297 (2012) (査読有) doi: 10.5582/ddt.2012.v6.6.291
- 6 Akiko Shiratsuchi, Toshinobu Mori, Kenji Sakurai, Kaz Nagaosa, Kazuhisa Sekimizu, Bok-Luel Lee, and Yoshinobu Nakanishi. Independent recognition of *Staphylococcus aureus* by two receptors for phagocytosis in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 287, 21663-21672 (2012) (査読有) doi: 10.1074/jbc.M111.333807
- 7 Ryo Okada, Kaz Nagaosa, Takayuki Kuraishi, Hiroshi Nakayama, Naoko Yamamoto, Yukiko Nakagawa, Naoshi Dohmae, Akiko Shiratsuchi, and Yoshinobu Nakanishi. Apoptosis-dependent externalization and involvement in apoptotic cell clearance of DmCaBP1, an endoplasmic reticulum protein of *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 287, 3138-3146 (2012) (査読有) doi: 10.1074/jbc.M111.277921
- 8 白土明子, 黄色ブドウ球菌細胞壁成分による自然免疫の誘導と制御。(総説) *生化学*, 84, 737-752 (2012) (査読無)
- 9 白土明子, 永長一茂, 中西義信. ショウジョウバエ胚におけるアポトーシス細胞貪食の検出. *実験医学*(別冊)「細胞死実験プロトコール」7 章: 169-174, 2011 (査読無)
- 10 白土明子, 中西義信. マウス肺組織における貪食の解析. *実験医学*(別冊)「細胞死実験プロトコール」7 章: 162-168, 2011 (査読無)
- 11 白土明子, 中西義信. アポトーシス細胞の in vitro 貪食反応. *実験医学*(別冊)「細胞死実験プロトコール」7 章: 154-161, 2011 (査読無)

[学会発表](計 14 件)

- 1 Akiko Shiratsuchi. Role of two-component regulatory system in bacterial pathogenicity. The first Asian Invertebrate Immunity Symposium. February 15, 2014 (Pusan, Korea)
- 2 白土明子, 倉石貴透. 第 36 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「宿主内環境により変化する微生物の反応と感染症」オーガナイザー 2013 年 12 月 4 日(神戸ポートアイランド 神戸市)
- 3 白土明子, 長田洋一, 中西義信. 精巢セルトリ細胞による黄色ブドウ球菌の貪食排除. 日本生化学会第 86 回大会 2013 年 9 月 12 日(パシフィコ横浜 横浜市)
- 4 島本尚人, 新田真央, 山本兼由, 石浜明, 中西義信, 白土明子. カタラーゼを利用した大腸菌のショウジョウバエへの持続感染. 日本生化学会第 86 回大会 2013 年 9 月 11 日(パシフィコ横浜 横浜市)
- 5 Akiko Shiratsuchi. Phagocytosis of apoptotic cells and bacteria with a common mechanism in *Drosophila*. Gordon Research Conference on Apoptotic Cell Recognition & Clearance. June 25, 2013. (Biddeford, ME, USA)
- 6 岡田亮, 永長一茂, 倉石貴透, 中山洋, 山本奈央子, 中川祐紀子, 堂前直, 白土明子, 中西義信. ショウジョウバエ小胞体タンパク質 DmCaPB1 のアポトーシス依存的な細胞外放出とアポトーシス細胞貪食の促進. 日本生化学会第 85 回大会 2012 年 12 月 16 日(福岡国際会議場 福岡市)
- 7 藤田融, 永長一茂, 白土明子, 中西義信. ショウジョウバエ貪食受容体 Draper のチロシンリン酸化による活性化. 日本生化学会第 85 回大会 2012 年 12 月 15 日(福岡国際会議場 福岡市)

- <sup>8</sup> 白土明子, Tran Quoc Tuan, 島本尚人, 山本兼由, 石浜明, 中西義信. ショウジョウバエモデルによる大腸菌シグマ因子 RpoS の細菌病原性への関与の解析. 日本生化学会第 85 回大会 2012 年 12 月 15 日(福岡国際会議場 福岡市)
- <sup>9</sup> Akiko Shiratsuchi, and Yoshinobu Nakanishi. Cooperation between two receptors for phagocytosis in defense against bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. XXIV International Congress of Entomology. August 23, 2012. (Daegu, Korea)
- <sup>10</sup> 白土明子. ショウジョウバエモデルによる宿主免疫と相互作用する細菌因子の遺伝学的解析. 日本生化学会第 84 回大会シンポジウム. 2011 年 9 月 22 日(国立京都国際会館 京都市)
- <sup>11</sup> 白土明子, 黒川健児. 日本生化学会第 84 回大会シンポジウム「感染や共生時における微生物-宿主間のコミュニケーション」オーガナイザー 2011 年 9 月 22 日(国立京都国際会館 京都市)
- <sup>12</sup> Akiko Shiratsuchi, and Yoshinobu Nakanishi. Role of D-alanylated wall teichoic acid in Toll-like receptor 2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress: XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. September 7, 2011 (Sapporo)
- <sup>13</sup> Afwa Firdausi, Akiko Shiratsuchi, Ayako Kori, Akira Ishihama, and Yoshinobu Nakanishi. Regulation of synthesis of *Escherichia coli* RNA polymerase sigma subunit in sepsis model infection in *Drosophila*. The Molecular Biology Society of Japan The 11<sup>th</sup> Spring Symposium/ International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa. May 25, 2011 (Ishikawa Ongakudo, Kanazawa)
- <sup>14</sup> 森俊暢, 櫻井健次, 中西義信, 白土明子. 黄色ブドウ球菌の貪食に関わるショウジョウバエ食細胞のインテグリンサブユニットの同定. 日本分子生物学会第 11 回春期シンポジウム/金沢がん生物国際シンポジウム北陸支部会第 28 回大会. 2011 年 5 月 25 日(石川県立音楽堂 金沢市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白土 明子 (SHIRATSUCHI, Akiko)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：90303297