

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291021

研究課題名(和文) 宿主との折り合いをつける細菌遺伝子の同定と機能解明

研究課題名(英文) Identificatin and characterization of bactrial genes for coexistence with hosts

研究代表者

中西 義信 (Nakanishi, Yoshinobu)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：40172358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：細菌感染において、生存が途絶えない程度に細菌増殖が抑えられ、菌量が過剰にならない程度に免疫反応が起これば、“細菌は排除されず宿主が病気になる状態”が作り出される可能性が高い。本研究では、ショウジョウバエをモデル宿主として、このような宿主と細菌との折り合いをもたらす細菌遺伝子が探索された。その結果、大腸菌の二成分制御系の一つであるEnvZ-OmpRをコードする遺伝子が見つかった。この“折り合い遺伝子”envZ-ompRは、外膜タンパク質OmpCの発現を誘導して細菌の宿主殺傷性を低下させてショウジョウバエと大腸菌の共存を導くと考えられた。この発見は新規の細菌感染症対策につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Bacterial infection often causes serious diseases. This could be avoided when the virulence of bacteria is kept sufficiently low. We hypothesize that bacteria possess a gene(s) that creates the coexistence of hosts and invading bacteria. This study was undertaken to identify such a bacterial gene using *Escherichia coli* and *Drosophila melanogaster* as a model bacterium and host, respectively. We identified envZ-ompR, a pair of genes coding for the two-component regulatory system EnvZ-OmpR, that mitigates the virulence of *E. coli* in *Drosophila*. The enhanced expression of envZ-ompR and the phosphorylation of EnvZ were observed under infectious state. Forced expression of ompC, one of the target genes of EnvZ-OmpR, rescued the virulence phenotype of an envZ-ompR mutant. OmpC as an outer membrane protein has been known to protect bacteria from a change of osmotic pressure. The mechanisms of the induction of envZ-ompR and a mode of actions of OmpC await further investigation.

研究分野：免疫生化学

キーワード：細菌感染症 自然免疫 ショウジョウバエ 大腸菌 遺伝子発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

細菌は依然として私たちの生命を脅かす病原因子であり、細菌感染症を予防・治療するためのより有効な医療が求められている。その一方で、私たちが細菌を利用し（発酵食品の生産など）また細菌と共生して（常在細菌叢との関わりなど）生きているのも事実である。これは、人類と細菌との関係を適切化すれば、細菌を撲滅することなく感染症を抑えることが可能なことを示唆する。

宿主内の環境は、細菌の生存と増殖に好ましい場であると同時に、細菌を攻撃する免疫反応の場としての意味も持つ。宿主に侵入した細菌は増殖しようとするが、菌数が増えれば宿主免疫に感知されやすくなる。一方、宿主が感染症を起こすと生体機能が低下し、細菌の増殖にとって不利な状況になってしまう。また、多くの感染症は過剰な免疫反応の結果であるとする考え方があり、免疫の程度を抑えることが感染症での病状の軽減につながる例も報告されている。つまり、生存が途絶えない程度に細菌増殖を抑え、菌量が過剰にならない程度に免疫反応を抑えれば、“宿主が病気になるはず細菌も排除されない状態”が作り出される可能性が高い。

近年になって、細菌が外界の変化にตอบสนองして自身の振舞いを変化させることが知られるようになり、Quorum Sensing や CRISPR-Cas システムなどの仕組みが提唱されている。これらの現象においては、多くの場合、細菌は遺伝子発現を変動させて環境変化に対応する。研究代表者は、細菌が宿主との間で“折り合い”を付ける際にも特定の遺伝子を利用すると仮定した。本研究では、これを実行する遺伝子すなわち“宿主との間で折り合いをつける細菌遺伝子(折り合い遺伝子)”を見いだして機能を解明することをめざす。

細菌が宿主へ侵入した際の最大の環境変化は、免疫による攻撃を受けることである。そのため、免疫系などの宿主因子が細菌に働きかけると、それが刺激物質(リガンド)となって折り合い遺伝子の発現が誘導されると予想することができる。また上述したように、折り合い遺伝子は細菌増殖または宿主免疫の抑制を通じて細菌の病原性を低下させる可能性が高い。そこで研究代表者は、“宿主に対する細菌の病原性を弱める細菌遺伝子”を探索することで折り合い遺伝子を見いだすことができると考えた。

## 2. 研究の目的

細菌の感染は自らの生存を維持するためであり、宿主が病気になるはず細菌も排除されない状態が両者にとって好ましいはずである。

研究代表者は、細菌は感染宿主内で特定の遺伝子を発現させて“宿主と折り合う状態”を導く、と仮定した。本研究では“細菌の折り合い遺伝子”を網羅的に探索して働きを解明する。研究成果は、感染症の原因として「細菌と宿主との折り合い状態の破綻」という新しい概念を提案するとともに、細菌感染症を予防・治療するための新奇医療の開発につながると期待される。

細菌には大腸菌、宿主としてキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を使うモデル感染系を利用する。遺伝学的実験を駆使して以下の3点を達成し、宿主と細菌との間での“折り合い状態”を規程する細菌遺伝子の存在を証明する。

(1) 宿主に対する病原性を低下させる細菌遺伝子 (= 折り合い遺伝子) を網羅的解析から見いだす。

(2) 細菌増殖と宿主免疫への影響に着目して、折り合い遺伝子の働きを明らかにする。

(3) 折り合い遺伝子の発現誘導を規定する宿主因子(リガンド)と細菌因子(受容体)を同定して働きを解明する。

## 3. 研究の方法

以下の順に研究を展開して、宿主との折り合いを可能にする細菌遺伝子を見だし、役割を明らかにするとともに感染時の発現機構の解明をめざす。

### (1) 折り合い遺伝子の同定

細菌遺伝子の発現調節を担う遺伝子群に注目し、それらの欠損で菌の病原性がどのように変化するかを調べる。欠損により菌の病原性が高まるものを選び、それらの標的遺伝子を探し出す。次に、標的遺伝子について、その欠損が元の変異菌と同じ表現形を示すものを選択する。そして、それらの遺伝子が感染時の菌の増殖にどのように影響するかを調べ、欠損させると菌が増えるかわらないかの効果を与える遺伝子を“折り合い遺伝子”として結論する。

### (2) 折り合い遺伝子の働き方の解明

折り合い遺伝子の作用が宿主の免疫系の変動を必要とするかどうかを知るために、感染時の抗菌ペプチドの産生量および宿主ヘモサイトの貪食能の程度を調べる。さらに、病原性変化へのサイトカイン様因子の必要性を知る。

### (3) 折り合い遺伝子の誘導機構の解明

折り合い遺伝子の発現調節を担う装置が、宿主への感染時にどのように変化するかを調べる。そして、その変化を与える宿主因子の同定を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 折り合い遺伝子の探索

細菌が宿主と折り合いをつける際には、自身の遺伝子発現様式を変化させると予想した。そこで、細菌遺伝子発現の調節を担う主要な装置である“二成分制御系 (two-component regulatory system)”に着目して研究を開始した。

二成分制御系は、細胞膜に存在するセンサーキナーゼと細胞質にあるレスポンスレギュレーターとから成る。センサーキナーゼは、刺激を受けると自身のヒスチジン残基をリン酸化し、そのリン酸基をレスポンスレギュレーターのアスパラギン酸残基に渡す機能を持つ、リン酸転移酵素である。一方、レスポンスレギュレーターはリン酸化で活性化される DNA 結合性の転写因子である。大腸菌には 30 種のセンサーキナーゼと 34 種のレスポンスレギュレーターが存在し、センサーキナーゼが環境変化を察知するとレスポンスレギュレーターを介して遺伝子発現パターンを変え、細菌が新しい環境に適応できるようにする。

まず、ショウジョウバエへの感染時に高い発現程度を示す二成分制御系をさがした。そのために、すべての二成分制御系をコードする遺伝子の転写プロモーター依存的に緑色蛍光タンパク質 (GFP) が発現するようにしたプラスミドを大腸菌に導入し、それらをシ

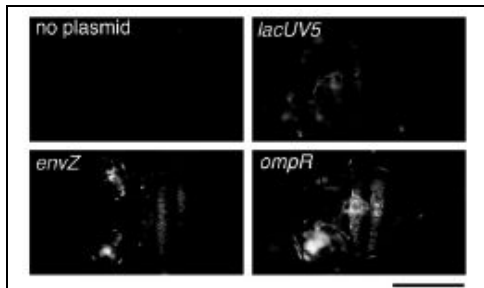


図1. GFPを発現する大腸菌を注入したショウジョウバエ成虫の蛍光顕微鏡での解析。背側から見た腹部の観察像が示されている。*lacUV5*は陽性コントロールとして使ったプロモーター、*envZ*と*ompR*は二成分制御系遺伝子のプロモーターをそれぞれ表す。GFPシグナルは白色、スケールバーは0.5 mm。

ョウジョウバエの成虫に感染させた。そして、ショウジョウバエを実体蛍光顕微鏡下に観察して GFP 由来のシグナルを検出し (図 1)、シグナル程度を数値化してプロモーター強度の指標とした。その結果、二成分制御系の種類により遺伝子プロモーターの強さは異なり、また組み合わせで働くセンサーキナーゼとレスポンスレギュレーターとでプロモーター強度は必ずしも一致しないことがわかった (図 2)。

次に、比較的プロモーター強度の高かった二成分制御系について、ショウジョウバエ感染時の宿主殺傷性への関与を調べた。大腸菌はショウジョウバエに対して病原性を示さないとされているが、比較的大量 (100 万個以上) に感染させると宿主は死に至る。そこで、

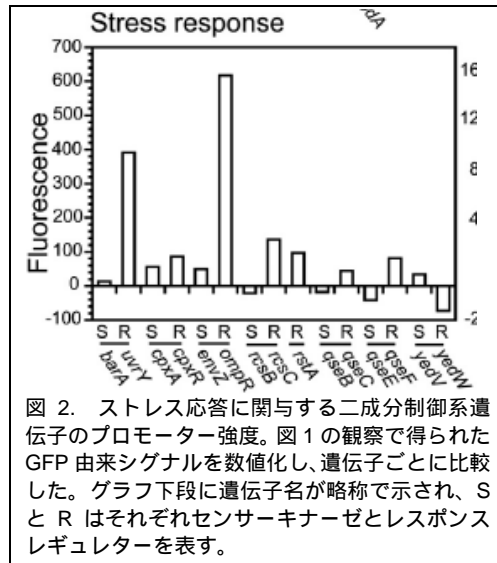


図 2. ストレス応答に関与する二成分制御系遺伝子のプロモーター強度。図 1 の観察で得られた GFP 由来シグナルを数値化し、遺伝子ごとに比較した。グラフ下段に遺伝子名が略称で示され、S と R はそれぞれセンサーキナーゼとレスポンスレギュレーターを表す。

注目する二成分制御系の遺伝子を欠損する大腸菌株を入手し (Keio Collection, 国立遺伝学研究所 National BioResource Project)、ショウジョウバエ成虫の腹部に感染させた。時間を追ってショウジョウバエの生存程度を調べると、二成分制御系 *EnvZ-OmpR* を欠損した菌の感染でショウジョウバエが早く死ぬことがわか

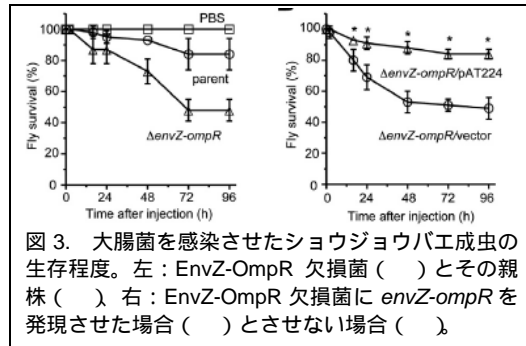


図 3. 大腸菌を感染させたショウジョウバエ成虫の生存程度。左: *EnvZ-OmpR* 欠損菌 ( ) とその親株 ( )。右: *EnvZ-OmpR* 欠損菌に *envZ-ompR* を発現させた場合 ( ) とさせない場合 ( )。

った (図 3 左)。さらに、この菌に強制的に *envZ* と *ompR* を発現させると、宿主殺傷性は元の低いレベルに戻った (図 3 右)。

*EnvZ-OmpR* を欠損した菌の増殖程度は、培地中でもショウジョウバエ感染時でも、野生型菌とほぼ同程度であった。よって、*EnvZ-OmpR* は宿主内での大腸菌の増殖には影響しないと思われた。そして、*EnvZ* と *OmpR* の mRNA 量がショウジョウバエへの感染後に増加することがわかった。さらに、大腸菌をショウジョウバエ成虫のヘモリンフ (体液) 中におくと、*EnvZ* のリン酸化が増大した。これらの結果は、ショウジョウバエへの感染時に *EnvZ-OmpR* が機能することを示唆する。

以上より、大腸菌遺伝子 *envZ-ompR* は本研究で目的とする“折り合い遺伝子”であると結論された。

### (2) 折り合い遺伝子の働き方の解明

*EnvZ-OmpR* 欠損による宿主殺傷性の増大は、抗菌ペプチド生産などを導く液性免疫応

答の低下したショウジョウバエでも観察された。また、EnvZ-OmpRの有無により、ショウジョウバエ幼虫ヘモサイトによる大腸菌の貪食程度に差は認められなかった。よって、EnvZ-OmpRによる大腸菌の病原性低下は、宿主の免疫反応の変化を伴わずに起きていると考えられた。

EnvZ-OmpRは大腸菌遺伝子の発現程度を変化させる装置であり、菌の病原性の調節を行う実行因子はこの装置で発現が促されるものと予想される。そこで、EnvZ-OmpRにより発現が誘導される7つの遺伝子の中に実行因子を探した。そのために、これら遺伝子の欠損菌をショウジョウバエに感染させて病原性の程度を調べた。すると、OmpCとよばれる大腸菌外膜のタンパク質をコードする遺伝子の変異菌が、親株菌と比べて高い宿主殺傷性を持つことがわかった。また、OmpCのmRNA量の増加が、ショウジョウバエへの感染あるいはショウジョウバエヘモリンフの大腸菌への添加で起こることが示された。さらに、EnvZ-OmpR欠損菌にOmpCを強制的に発現させると、菌の宿主殺傷性が低下した。以上の結果より、EnvZ-OmpRによる大腸菌の病原性抑制はOmpCにより担われていると結論された。OmpCは大腸菌の外膜に存在するタンパク質であり、イオン透過性を調節して菌に及ぶ浸透圧の影響を軽減する役割を担う。このようなタンパク質が菌の病原性をどのような仕組みで抑制するのかは、今後の解析を待つことになる。

### (3) 折り合い遺伝子の誘導機構の解明

*envZ-ompR*の発現はショウジョウバエ感染時に増大し、ヘモリンフに含まれる成分がその発現とEnvZのリン酸化を誘導すると考えられる。EnvZ-OmpRはストレス応答性の二成分制御系であり、これまで浸透圧変化などを感知して働くことが知られる。EnvZに働きかけるヘモリンフ成分の同定が今後に取り込まれるべき重要課題の一つとして残された。

## 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 4 件)

(1) Nainu, F., Tanaka, Y., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. Protection of insects against viral infection by apoptosis-dependent phagocytosis. *J. Immunol.* 195 (2015), 5696-5706, 査読有

(2) Kong, Q., Nakai, Y., Kuroda, N., Shiratsuchi, A., Nagaosa, K., and Nakanishi, Y. Peptidoglycan recognition protein-triggered induction of *Escherichia coli* gene in *Drosophila melanogaster*. *J. Biochem.* 157 (2015), 507-517, 査読有

(3) Shiratsuchi, A., Shimamoto, N., Nitta, M., Tuan, T. Q., Firdausi, A., Gawasawa, M.,

Yamamoto, K., Ishihama, A., and Nakanishi, Y. Role for  $\square^{38}$  in prolonged survival of *Escherichia coli* in *Drosophila melanogaster*. *J. Immunol.* 192 (2014), 666-675, 査読有

(4) Pukklay, P., Nakanishi, Y., Nitta, M., Yamamoto, K., Ishihama, A., and Shiratsuchi, A. Involvement of EnvZ-OmpR two-component system in virulence control of *Escherichia coli* in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438 (2013), 306-311, 査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

(1) 中西義信、細胞貪食による生体恒常性の維持、文部科学省 新学術領研究「転写代謝システム」 転写代謝セミナー、2015年12月、筑波大学生命領域学際研究センター(つくば市)

(2) Firzan Nainu, Yumiko Tanaka, Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi、Apoptosis-dependent phagocytosis of virus-infected cells in *Drosophila*: an evolutionarily conserved antiviral mechanism、第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会年会合同大会 ワークショップ：糖鎖を利用した、異物と宿主の生存戦略、2015年12月、神戸ポートアイランド(神戸市)

(3) 白土明子、伊藤貴弘、黒田阿友美、島本尚人、山本兼由、石浜明、中西義信、大腸菌二成分制御系 EnvZ-OmpR の宿主内持続感染と宿主傷害性における役割、第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会年会合同大会、2015年12月、神戸ポートアイランド(神戸市)

(4) 有原大貴、中西義信、白土明子、ショウジョウバエ貪食受容体 Draper の細胞外EMI/NIM領域の黄色ブドウ球菌貪食排除への役割の解析、第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会年会合同大会、2015年12月、神戸ポートアイランド(神戸市)

(5) 孔慶権、中井雄治、黒田奈々恵、白土明子、永長一茂、中西義信、ショウジョウバエのペプチドグリカン認識タンパク質PGRP-LCによる大腸菌遺伝子の発現誘導、第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会年会合同大会、2015年12月、神戸ポートアイランド(神戸市)

(6) 小宮山千晴、中西義信、白土明子、抗菌薬による黄色ブドウ球菌の被貪食能の促進、日本薬学会北陸支部第127回例会、2015年11月、富山大学(富山市)

(7) Firzan Nainu, Yumiko Tanaka, Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi、Targeted elimination of virus-infected cells by apoptosis-dependent phagocytosis in

*Drosophila melanogaster*、TOLL 2015、Targeting Innate Immunity、2015年10月、Palacio de Congresos de Mabella (Marbella, Spain)

(8) Yoshinobu Nakanishi、Apoptosis-dependent phagocytosis of virus-infected cells as antiviral immunity in *Drosophila*、Gordon Research Conferences: Apoptotic Cell Recognition & Clearance-Physiological significance and pathological consequences、2015年6月、University of New England (Biddeford, ME, USA)

(9) Akiko Shiratsuchi、Control of phagocytic killing of bacteria by two-component gene regulatory system for persistent infection in *Drosophila*、Gordon Research Conferences: Apoptotic Cell Recognition & Clearance-Physiological significance and pathological consequences、2015年6月、University of New England (Biddeford, ME, USA)

(10) 島本尚人、新田真緒、山本兼由、石浜明、中西義信、白土明子、大腸菌シグマ因子 RpoS によるショウジョウバエへの持続感染、日本生化学会北陸支部第33回大会、2015年5月、日本生化学会北陸支部第33回大会、富山大学(富山市)

(11) 伊藤貴弘、黒田阿友美、山本兼由、石浜明、中西義信、白土明子、大腸菌二成分系 EnvZ-OmpR による宿主感染時の病原性の調節、2015年5月、日本生化学会北陸支部第33回大会、富山大学(富山市)

(12) Firzan Nainu, Yumiko Tanaka, Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi、Antiviral role for phagocytic elimination of virus-infected cells in insects、2015年5月、日本生化学会北陸支部第33回大会、富山大学(富山市)

(13) 中西義信、ショウジョウバエにおける細菌とウイルスの感染への防御機構、第23回病害動物の生理分子生物談話会、2015年3月、金沢大学宝町キャンパス(金沢市)

(14) Firzan Nainu, Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi、Involvement of apoptosis-dependent phagocytosis in protection of insect against viral infection、第87回日本生化学会大会、2014年10月、京都国際会議場(京都市)

(15) 白土明子、アポトーシス細胞と細菌の貪食機構の共通性と進化的な保存、第87回日本生化学会大会、2014年10月、京都国際会議場(京都市)

(16) Firzan Nainu, Akiko Shiratsuchi, Kaz Nagaosa, Yoshinobu Nakanishi、Role for apoptosis-dependent phagocytosis in antiviral immunity of *Drosophila*、第11回日本ショウジョウバエ研究会、2014年6月、金沢歌劇座(金沢市)

(17) Firzan Nainu, Akiko Shiratsuchi, Kaz Nagaosa, Yoshinobu Nakanishi、Inhibition of virus growth by apoptosis-dependent phagocytosis of virus-infected cells in *Drosophila melanogaster*、The First Asian Invertebrate Immunity Symposium、2014年2月、Pusan National University (Busan, Korea)

(18) Qingquan Kong, Yuji Nakai, Kaz Nagaosa, Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi、Altered gene expression in *Escherichia coli* after exposure to immune proteins of *Drosophila melanogaster*、The First Asian Invertebrate Immunity Symposium、2014年2月、Pusan National University (Busan, Korea)

(19) Akiko Shiratsuchi、Role for two-component regulatory system in bacterial pathogenicity、The First Asian Invertebrate Immunity Symposium、2014年2月、Pusan National University (Busan, Korea)

(20) 島本尚人、新田真緒、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、第86回日本生化学会大会、2013年9月、パシフィコ横浜(横浜市)

(21) Akiko Shiratsuchi、Phagocytosis of apoptotic cells and bacteria with a common mechanism in *Drosophila*、Gordon Research Conferences: Apoptotic Cell Recognition & Clearance、2013年6月、University of New England (Biddeford, ME, USA)

〔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〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中西 義信 (NAKANISHI, Yoshinobu)  
金沢大学・医薬保健研究域薬学系・教授  
研究者番号：40172358

研究者番号：

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

白土 明子 (SHIRATSUCHI, Akiko)  
金沢大学・医薬保健研究域薬学系・准教授  
研究者番号：90303297