

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440049

研究課題名(和文) 宿主内で発現変動する細菌遺伝子による貪食反応への抵抗性と感染維持の調節機構

研究課題名(英文) Mechanism for regulation of bacterial genes to escape from phagocytosis for persistent infection 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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：宿主環境下の細菌は、その遺伝子発現を変化させて、宿主内に適応して生存する。本研究により、大腸菌の二成分制御系EnvZ-OmpRに制御されて宿主傷害性を調節する遺伝子が見出された。また、RNA合成酵素シグマ因子のRpoSに関して、細菌カタラーゼ遺伝子発現を誘導して貪食殺菌回避することを報告してきたが、本研究により、RpoSは宿主への感染時に遺伝子発現の転写後段階で発現亢進して感染維持に働くことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Bacteria under hostile environmental conditions alter their gene expression to adapt and survive in the host. This study identified genes in Escherichia coli that acted for regulation of virulence in host with aid of the two-component regulatory system EnvZ-OmpR. Among sigma factors, we reported that RpoS, a type of RNA polymerase sigma factors in E. coli, induced expression of bacterial catalases for inhibition of phagocytic killing in host. In this study, we found that RpoS raised in host in a manner of post-transcriptional regulation for persistence in host.

研究分野：生化学

キーワード：自然免疫 細菌 細胞貪食 遺伝子発現 感染症

### 1. 研究開始当初の背景

細菌が宿主に侵入すると、宿主内に含まれる物質、温度や酸素濃度あるいは pH などを含めた、大きな環境変化にさらされる。また、宿主免疫が活性化して細菌を排除する反応を発動する。細菌が感染を続けるには、免疫による攻撃を回避して宿主内の環境に適応する必要があるため、宿主因子を認識することにより遺伝子発現を変化させ、感染時に特有の遺伝子発現様式を持つと考えられる。細菌が外界変化に应答するシステムとして、これまでに、クオラムセンシングが知られており、細菌が生育環境変化を感知する分子機構が明らかにされてきている。

細菌の遺伝子発現の調節機構の代表としては、RNA 合成酵素のシグマ因子による転写される遺伝子の選択、二成分制御系と呼ばれる情報経路の選択が知られてきた。近年はこれらに加えて、mRNA の安定性や翻訳効率を調節することによる転写後調節の重要性も提唱されている。研究代表者はこれまでに、大腸菌 *Escherichia coli* とキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を細菌と宿主に利用するモデル系で、感染時に高レベルを示す二成分制御系因子を見出しており、また、シグマ因子の RpoS が感染時に発現亢進して貪食殺菌の回避に働くことも明らかにした。これらの制御下遺伝子群の中に、感染維持や宿主傷害の調節を行う遺伝子が存在すると考えられる。

### 2. 研究の目的

上述した背景に基づいて、細菌の遺伝子発現制御系による、感染維持と宿主傷害の分子機構を明らかにすることを目的として、二成分制御系とシグマ因子に着目する。そのために、宿主内で高レベルを示す大腸菌二成分制御系の制御下遺伝子の中から感染調節に働く遺伝子を同定して、感染維持や宿主傷害への当該遺伝子の働きを見出す。また、RNA 合成酵素のシグマ因子 RpoS の発現を遺伝子発現の各段階で調べ、感染に伴う発現亢進機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

細菌と宿主の両者に遺伝学を駆使した解析

ができることから、本研究では、細菌に大腸菌を、宿主にキイロショウジョウバエを用いたモデル感染系を利用した。ショウジョウバエの自然免疫は、ヒトを含む哺乳類にその基本機構が進化的に保存されている。専門食細胞であるマクロファージに相当するヘモサイトでは、細菌の認識や貪食にかかわる受容体や情報経路、排除機構が哺乳類とほぼ同じであり、in vitro および in vivo の両者の実験が可能である。感染実験ではショウジョウバエの体腔に細菌を注入し、宿主傷害性や感染持続を評価した。また、ハエから取り出した食細胞、または食細胞株に細菌を加えて貪食反応を解析した。ショウジョウバエと大腸菌の遺伝子発現レベルは、タンパク質、RNA、および転写プロモーター活性を調べて評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 大腸菌二成分制御系 EnvZ-OmpR による感染調節に働く遺伝子の同定

細菌の情報経路である二成分制御系は、細胞膜の膜型ヒスチジンキナーゼである受容体と、転写調節因子の2つから構成され、約50因子が報告されている。研究代表者は、膜受容体の EnvZ と転写調節因子の OmpR から構成される経路を欠く大腸菌は、宿主への傷害活性が高いことを見出している。EnvZ-OmpR に制御されるレギュロン遺伝子群について、それぞれの遺伝子欠損菌株を用いて、EnvZ-OmpR 欠損時と類似の表現型を示す種類をスクリーニングした。その結果、複数種類の遺伝子が欠損により宿主傷害性を亢進させるとわかり、このうち EnvZ-OmpR の働きを補うものとして *ompC* 遺伝子が見出された。*ompC* 遺伝子は大腸菌の外膜タンパク質をコードしており、その mRNA 量は EnvZ-OmpR により正に制御され、感染にもなって亢進した。このことから、宿主に侵入した大腸菌では、EnvZ-OmpR により OmpC が発現亢進して宿主への傷害性が抑制されると考えられた。

#### (2) EnvZ-OmpR-OmpC による宿主傷害抑制作用

ショウジョウバエの免疫および組織傷害に関連する遺伝子のうち、EnvZ-OmpR と

OmpC による傷害抑制作用に関連する種類を  
探した。候補遺伝子群の変異体や発現抑制体  
を用いた感染実験により評価した。細菌への  
免疫応答を担う IMD 経路を担う IMD,  
PGRP-LE, PGRP-LC の変異体, また, 組織傷  
害修復に関わる JAK-STAT 経路の因子群, ラ  
ジカル産生や分解に働く酵素群の遺伝子変  
異体のいずれでも, OmpC の働きが保持され  
たことより, OmpC の作用はこれらの八工因  
子を必要とせずに発揮されると考えられた。

### (3) EnvZ-OmpR を活性化する宿主因子

二成分制御系は, 自己リン酸化により活性  
化する膜受容体のヒスチジンキナーゼが, 転  
写因子を活性化して, 制御下遺伝子の発現を  
調節する。感染時の大腸菌では膜受容体の  
EnvZ がリン酸化すると考えられることから,  
大腸菌抽出液を生化学的に解析したところ,  
ショウジョウバエ体液の共培養により EnvZ  
がリン酸化することがわかった。

### (4) 大腸菌シグマ因子 RpoS の感染時の 発現調節

RNA 合成酵素は活性サブユニットとシグ  
マ因子から構成され, 大腸菌には 7 種類のシ  
グマ因子が存在する。それぞれが塩基配列の  
異なる DNA と結合する性質を持ち, 転写プ  
ロモーター領域に結合して, 転写を受ける遺  
伝子を決定する。これまでに, 宿主へ感染し  
た大腸菌では RpoS タンパク質レベルが亢進  
し, RpoS に発現制御される細菌カタラーゼ  
の発現量が増えて, 大腸菌が宿主感染を維持  
することを報告している。発現亢進の仕組み  
を知るために, *rpoS* 遺伝子転写プロモータ  
ー活性を調べると感染の前後で差はなく, 転  
写後調節されると考えられた。細菌の転写後  
調節を担う因子として, RNA シャペロンタン  
パク質 Hfq が知られている。Hfq は翻訳され  
ない低分子 RNA と複合体を形成して RNA の  
立体構造を保ち, これが標的 mRNA と結合す  
ることにより, mRNA レベルを正負に調節し,  
また翻訳効率を変化させることが知られて  
いる。遺伝子変異菌株を用いた解析により,  
感染に伴う RpoS の発現亢進に Hfq が必要で  
あることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1 Shiratsuchi, A., Nitta, M., Kuroda, A.,  
Komiyama, C., Gawasawa, M., Shimamoto, N.,  
Tran Quoc, T., Morita, T., Aiba, H., and  
Nakanishi, Y. Inhibition of phagocytic killing of  
*Escherichia coli* in *Drosophila* hemocytes by  
RNA chaperon Hfq. *J. Immunol.* 197, 1298-1307  
(2016) doi: 10.4049/jimmunol.1501953 (査読有  
り)

2 Nainu, F., Tanaka, Y., Shiratsuchi, A., and  
Nakanishi, Y. Protection of insects against viral  
infection by apoptosis-dependent phagocytosis. *J.*  
*Immunol.* 195, 5696-5706 (2015) doi:  
10.4049/jimmunol.1500613 (査読有り)

3 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, 507-517 (2015) doi:  
10.1093/jb/mvv002 (査読有り)

4 白土明子. 自然免疫としての細胞貪食に  
よるアポトーシス細胞と細菌の排除機構と  
意義. (総説) *化学と生物*, 53, 38-41 (2015)

5 Shiratsuchi, A., Shimamoto, N., Nitta, M., Tuan,  
T. Q., Firdausi, A., Gawasawa, M., Yamamoto, Y.,  
Ishihama, A., and Nakanishi, Y. Role for sigma38  
in prolonged survival of *Escherichia coli* in  
*Drosophila melanogaster*. *J. Immunol.* 192,  
666-675 (2014) doi: 10.4079/jimmunol.1300968  
(査読有り)

〔学会発表〕(計 18 件)

1 Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi.  
Posttranscriptional regulation of bacterial genes  
for persistence infection in *Drosophila*. 2<sup>nd</sup> Asian  
Invertebrate Immunology Symposium 2016 年 10  
月 15 日 (Hangzhou University, Hangzhou,  
China)

2 白土明子, 小宮山千晴, 黒田阿友美, 中西  
義信. RNA シャペロン Hfq による細菌の宿主感  
染維持への役割. 第 89 回日本生化学会大会  
2016 年 9 月 25 日 東北大学川内北キャンパス  
(仙台市)

3 小宮山千晴, 中西義信, 白土明子.  
*Drosophila* C virus 感染免疫へのショウジョウバ  
エ Draper の働き. 第 89 回日本生化学会大会  
2016 年 9 月 25 日 東北大学川内北キャンパス  
(仙台市)

4 白土明子. ショウジョウバエ宿主モデルを利  
用した細菌の病原性調節遺伝子の解析(招待  
講演) 近畿大学生物理工学部セミナー. 2016  
年 2 月 29 日 近畿大学生物理工学部(和歌山  
市)

5 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 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会第 88 回大会 合同大会 (BMB2015) 2015 年 12 月 3 日 神戸ポートアイランド(神戸市)

6 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 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会第 88 回大会 合同大会 (BMB2015) 2015 年 12 月 1 日 神戸ポートアイランド(神戸市)

7 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 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会第 88 回大会 合同大会 (BMB2015) 2015 年 12 月 1 日 神戸ポートアイランド(神戸市)

8 山本(日野)美樹, 白土明子. 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会第 88 回大会 合同大会 (BMB2015) ワークショップオーガナイザー: 糖鎖を利用した、異物と宿主の生存戦略 2015 年 12 月 3 日 神戸ポートアイランド(神戸市)

9 Firzan Nainu, Yumiko Tanaka, Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi. Apoptosis-dependent phagocytosis of virus-infected cells in Drosophila: an evolutionarily conserved antiviral mechanism. (招待講演) 第 88 回日本生化学会第 88 回大会 合同大会 (BMB2015) ワークショップオーガナイザー: 糖鎖を利用した、異物と宿主の生存戦略 2015 年 12 月 3 日 神戸ポートアイランド(神戸市)

10 Akiko Shiratsuchi. Role for bacterial phagocytosis by hemocytes on control of bacterial pathogenicity in Drosophila. Gordon Research Conferences: Apoptotic Cell Recognition & Clearance 2015 年 6 月 14-19 日 (University of New England, Biddeford, Maine, U.S.A.)

11 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. 第 33 回日本生化学会北陸支部会. 2015 年 5 月 24 日 富山大学(富山市)

12 Firzan Nainu, Yumiko Tanaka, Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakankshi. Antiviral role for phagocytic elimination of virus-infected cells in insects. 第 33 回日本生化学会北陸支部会 2015 年 5 月 24 日 富山大学(富山市)

13 Akiko Shiratsuchi. Role for two-component regulatory system in virulence control of bacteria in Drosophila. (招待講演) 日本韓国二国間共

同研究講演会(ソウル大学、韓国)2015 年 1 月 28 日

14 白土明子. 免疫を感知することによる細菌の病原性調節機構.(招待講演) 熊本大学拠点形成研究 A 主催講演会 2014 年 11 月 21 日(熊本大学, 熊本市)

15 黒川健児, 白土明子. 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウムオーガナイザー: 生体膜を利用した細胞内外の処理による生体恒常性の維持 2014 年 10 月 18 日国立京都国際会館(京都市)

16 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(招待講演)第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム: 生体膜を利用した細胞内外の処理による生体恒常性の維持 2014 年 10 月 18 日国立京都国際会館(京都市)

17 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 18 日 国立京都国際会館, 京都市)

18 Firzan Nainu, Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi. Role for apoptosis-dependent phagocytosis in antiviral immunity of Drosophila. 11th Japanese Drosophila Research Conference (Biddeford, ME, U.S.A.)

〔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.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

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし