

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07331

研究課題名(和文) 宿主内で活性化する細菌遺伝子発現制御系と食細胞を介する感染調節

研究課題名(英文) Study on bacterial gene expression activated in host and regulation of phagocytosis-mediated infectious diseases

研究代表者

白土 明子 (Shiratsuchi, Akiko)

札幌医科大学・医療人育成センター・教授

研究者番号：90303297

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)：宿主内におかれた細菌は、宿主内環境を感知して遺伝子発現を変化させ、宿主内の環境に適応して生存をつづけるとともに、宿主への毒性を変化させて傷害を与えたりする。大腸菌の二成分制御系の中には、宿主内で活性化して宿主殺傷能を増減する種類が存在した。このうち、EnvZとOmpRにより制御される遺伝子群の中に、宿主殺傷能を担う種類が存在した。この遺伝子は、未知の毒性因子の細菌内の量を変化させて、細菌の宿主への傷害性を調節すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌感染は他の多くの疾患のリスク因子であり、感染症のみならず全身性の疾患の理解に必須となってきた。また、細菌の中には実験室環境では強い毒性を持たないにもかかわらず、重篤な感染症を引き起こす種類も存在する。細菌には環境を感知して遺伝子発現を変化させる仕組みがあることから、宿主内で発現変動して毒性を調節し、細菌も宿主も死なないようにして感染を続ける機構が細菌に備わっている可能性がある。本研究では、そのように働く受容体と実行因子遺伝子を同定した。当該受容体を標的として、化合物や天然物、あるいは承認薬の中から、新たな考えに基づいた医薬品や抗菌商品に繋がるものが見出される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Bacteria under hostile environmental conditions change their gene expression with aid of the two-component system (TCS), a bacterial signaling system, to adapt and survive in the host. This study identified several genes coding TCS factors acted for regulation of bacterial virulence. EnvZ-OmpR regulated one gene that codes membrane-located protein to enhance host-killing activity through altering level of unknown virulence factor in bacteria.

研究分野：免疫生化学

キーワード：自然免疫 感染症 細菌 二成分制御系 宿主

1. 研究開始当初の背景

細菌感染症に関する研究では、宿主が細菌を感知しその生存や増殖を抑制するよう攻撃する、免疫を誘導する仕組みにこれまで多くの知見が集まっている。一方で、宿主に侵入した細菌も、宿主内の物質や、生体外と異なる物理化学的環境に接する。細菌が宿主内で生きて感染を続けるには、免疫による攻撃を回避して宿主環境に適応する必要がある。そのために、細菌には環境を感知して遺伝子発現を変化させて、宿主内で特有の遺伝子発現様式を持つと考えられる。

細菌の遺伝子発現調節を主に担うものとして、二成分制御系と名付けられた情報経路の各種、RNA 合成酵素のシグマサブユニットの種類の使い分け、さらに近年は、mRNA の安定性や翻訳効率に影響を与える制御性 RNA の仕組みが明らかにされてきている。研究代表者はこれまでに、大腸菌 *Escherichia coli* を細菌として、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を宿主に選び、細菌と宿主の両者に遺伝学の利用できるモデル系を用いて、宿主と接触した細菌の遺伝子発現変化制御因子の量的変化や活性化状態の変化を網羅的に解析してきた。これまでに感染症や毒性への寄与が報告されている種類の他に、まだ働きの詳細が調べられていない種類も見出されてきており、これらの因子とその制御下遺伝子の解析により、感染維持や宿主への毒性を調節する遺伝子やタンパク質が見出される可能性がある。

2. 研究の目的

上述した研究背景と研究代表者のこれまでの成果に基づいて、細菌の遺伝子発現制御系による、宿主との相互応答により宿主免疫を回避して感染成立と維持に働く、あるいは、宿主への毒性や障害性を発揮する仕組みを明らかにすることを目的とした。そのために、本研究では、これまでの解析で見出された、宿主に応答する二成分制御系について、感染症との関係のあるものを探し、さらにその制御下遺伝子群の中から、宿主への感染や毒性の調節に働く遺伝子や遺伝子産物を同定して、その働きを調べた。また、当該情報経路の活性を変化させる、宿主内の因子を分離同定することを目指した。

3. 研究の方法

大腸菌標準株とこれを親株とした変異菌株、キイロショウジョウバエ野生型系統と遺伝子発言変異体入手あるいは作成した。ショウジョウバエの自然免疫はその基本機構がヒトを含む哺乳類に進化的に保存されている。また、ショウジョウバエの器官系や各組織には、哺乳類と構造や細胞機能に共通性のある種類もわかってきており、近年はショウジョウバエを用いた各種の疾患モデルが報告されてきている。これらのことから、本研究ではショウジョウバエの体腔に細菌を注入する方法と、細菌を傾向摂取させる方法とを用いて、様々な組織に細菌を存在させるようにした。ショウジョウバエの生存率や体内に存在する生菌数を調べるとともに、宿主と細菌のタンパク質や mRNA レベルから、免疫反応の活性化や細菌の回避機構を調べた。一方、ショウジョウバエの体液を回収してそこに含まれる血球系細胞を分け取り、細菌と免疫細胞とを混ぜて両者の応答を調べた。また、液性成分を処理して二成分制御系の活性変動を誘導する物質の性質を調べ、各種の分離方法を用いてその実体を探した。

4. 研究成果

(1) 感染調節に働く大腸菌二成分制御系とその制御下遺伝子の解析

細菌の環境感知の仕組みである、二成分制御系は2種類のタンパク質から構成される。それらは、膜型ヒスチジキナーゼと、転写調節因子であり、それぞれ多数の種類が存在する。また、グラム陰性細菌である大腸菌の二成分制御系を構成するタンパク質約50種類がほぼ同定されており、病原性細菌を含めた多くのグラム陰性細菌と共通する種類も多い。

本研究では、ショウジョウバエ体内で活性化状態の高い二成分制御系を EnvZ-OmpR を含めて複数種類得て、当該二成分制御系因子をコードする遺伝子の欠損菌株や外来発現株を入手または作り、ショウジョウバエの殺傷能力や体内の生菌数を求めた。その結果、宿主殺傷能の亢進に働くもの、抑制に働くものが新たに見つかった。また、細菌を注入後の宿主内での生菌数はある条件下で飼育時間の経過に伴い、増大、減少に働く種類の他に、一定となるように働くと考えられる結果を示した種類もあった。

これまでに、EnvZ-OmpR 制御下遺伝子は数十種類が共同研究者により見出されており、感染との関係が調べられていない遺伝子も多く含まれる。そこで、envZ 遺伝子と ompR 遺伝子を欠損させた株に、これらの遺伝子を外来発現させて、欠損時の性質が回復するものを感染実験により探した。今回の解析で、新たにこの情報経路による宿主殺傷能の亢進を担うと考えられる遺伝子が見出された。

(2) 宿主殺傷能調節因子の機能解析

このうち、上記経路の実行因子と見出している遺伝子は、データベース上の配列から膜に局在すると予想されるタンパク質をコードしている。その遺伝子産物の宿主への働きを、宿主への注

入実験や、体液から取り出した免疫細胞、および、株細胞を用いて解析した。その結果、当該タンパク質そのものには毒性がないと考えられ、また、IMD 経路に発現制御される抗菌ペプチド産生レベルに影響がないことから自然免疫の液性経路と傷害性とは関係は低く、また、免疫細胞による貪食殺菌にも影響がないことから細胞性経路とも、宿主殺傷能調節とは関係ないと考えられた。微生物感染だけでなく、腫瘍形成や両者の組み合わせによっても、免疫経路に活性変動が生じ傷害への影響がありうることを、研究代表者は共同研究者とともに見つけている。しかし、本経路はこの場合とは異なる仕組みで傷害を導くと考えられた。つづいて、このタンパク質の欠損菌株と親菌株について、それぞれの素抽出液を遠心分離して画分の宿主傷害活性を調べたところ、膜成分中に毒性があり、その活性は欠損菌株の方が高いことがわかった。これより、これまで見出した情報経路とその実行因子は、未知の毒性成分の細菌存在量を調節することで、宿主傷害活性に働くと考えられた。

(3) EnvZ-OmpR 経路を活性化する宿主因子

本経路を含めた二成分制御系の活性化は次の様に起きる。まず、膜型ヒスチジンキナーゼのリン酸化が生じ、次に、そのリン酸基が転写因子に転移されることで、リン酸化を受けた転写因子が制御下遺伝子 DNA の転写調節領域に結合できるようになり、転写反応の調節が行われる。そこで、FLAG タグとの融合タンパク質としてヒスチジンキナーゼを発現させる大腸菌を準備し、ショウジョウバエから取り出した体液と混ぜて、その抽出液に含まれるヒスチジンキナーゼを FLAG を利用して検出できるようにした。リン酸化レベルの解析は、リン酸基補足性の tag を結合させたゲル電気泳動により、リン酸化体と非リン酸化体を分離することで行なった。その結果、ショウジョウバエの体液によりヒスチジンキナーゼがリン酸化し、さらに、体液中の血球細胞成分を除いても変化しなかったことより、液性成分に含まれるとわかった。続いて、液性成分を加熱処理、各種の分解酵素や阻害剤で処理してから同様の実験を行なったところ、加熱処理によっても活性はほぼ完全に保たれ、活性を低下させる阻害剤は見つからなかった。そこで、限外ろ過を行なって液性因子を分離して解析したところ、リン酸化を導く活性は低分子である可能性が高まった。大腸菌の EnvZ は、ショウジョウバエ体液の液性成分中の小型分子によりリン酸化されると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nagaosa K, Shiratsuchi A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Using Drosophila to study the mechanisms of cancer development and prevention.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Cent. Med. Edu. Sapporo Medical University	6. 最初と最後の頁 9-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15114/jcme.12.9	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 Zheng M, Nagoya K, Nakai Y, Yasugai T, Kushihiki M, Rahmatika D, Sato M, Shiratsuchi A, Nakanishi Y.	4. 巻 25
2. 論文標題 Role for phagocytosis in the prevention of neoplastic transformation in Drosophila.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 675-684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12804	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 該当する
1. 著者名 Nainu F, Nakanishi Y, Shiratsuchi A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Fruit fly as a model organism in the study of human diseases and drug discovery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Cent. Med. Edu. Sapporo Medical University	6. 最初と最後の頁 21-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15114/jcme.10.21	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 該当する
1. 著者名 Ekowati H, Arai J, Damana Putri AS, Nainu F, Shiratsuchi A, Nakanishi Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Protective effects of Phaseolus vulgaris lectin against viral infection in Drosophila.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Drug Discov Ther.	6. 最初と最後の頁 329-335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/ddt.2017.01071.	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 該当する

1. 著者名 Nonaka S, Shiratsuchi A, Nagaosa K, Nakanishi Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 Mechanisms and Significance of Phagocytic Elimination of Cells Undergoing Apoptotic Death.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1819-1827.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00478.	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 該当する

1. 著者名 Nainu F, Shiratsuchi A, Nakanishi Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Induction of Apoptosis and Subsequent Phagocytosis of Virus-Infected Cells As an Antiviral Mechanism.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 1220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2017.01220	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 該当する

1. 著者名 Nonaka S, Ando Y, Kanetani T, Hoshi C, Nakai Y, Nainu F, Nagaosa K, Shiratsuchi A, Nakanishi Y.	4. 巻 292
2. 論文標題 Signaling pathway for phagocyte priming upon encounter with apoptotic cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 8059-8072.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M116.769745.	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 該当する

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 白土明子
2. 発表標題 細菌受容体を介した宿主毒性制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永長一茂, 張敏, 西千恵子, 中井雄治, 白土明子, 中西義信
2. 発表標題 食食受容体による癌予防に関する研究
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第86回例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白土明子, 有木茂, 木戸浦悠人, 長谷川浩, 中西義信
2. 発表標題 タバコ成分による大腸菌の遺伝子発現制御系活性への影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Shiratsuchi
2. 発表標題 Regulation of bacterial virulence in infectious condition
3. 学会等名 Symposium of the European Network for Aggregatibacter actinomycetemcomitans Research 2019年9月25日 The European Network for Aggregatibacter actinomycetemcomitans Research 招待有り(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白土明子, 山下哲, 天笠雄太, 小宮山千晴, 成田知也, 山本兼由, 石浜明, 中西義信
2. 発表標題 宿主感染時の大腸菌の毒性抑制機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白土明子
2. 発表標題 宿主感知による細菌の遺伝子発現変動と宿主との共存
3. 学会等名 2019年度日本生化学会北海道支部例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Shiratsuchi
2. 発表標題 細菌の混合感染による宿主毒性の制御（和訳）
3. 学会等名 ウメオ大学歯学部セミナー（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiratsuchi A, Amagasa Y, Yamashita S & Nakanishi Y.
2. 発表標題 Role for outer membrane protein OmpC on Escherichia coli virulence for control infection in host.
3. 学会等名 3rd Asian Invertebrate Immunity Symposium（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白土明子
2. 発表標題 ショウジョウバエ遺伝学を用いた疾患モデル研究の展開
3. 学会等名 札幌医科大学病態生理リサーチカンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白土明子
2. 発表標題 細菌の宿主環境の感知による感染制御機構
3. 学会等名 2017年度日本薬学会第138年会. シンポジウム「生物の環境認識メカニズムの理解と応用への可能性」(金沢)(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白土明子
2. 発表標題 大腸菌二成分制御系による宿主感染と傷害の調節.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 第40回日本分子生物学会年会・日本生化学会第90回大会合同大会. ワークショップ「環境変化とそれに応答する細胞内変化の再発見」(神戸)(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shiratsuchi, A.
2. 発表標題 Transcriptional control of bacterial genes in host organism: role for two-component system in infection diseases.
3. 学会等名 Seoul National University School of Dentistry Symposium on Infection and Immunity. (韓国)(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shiratsuchi, A.
2. 発表標題 Role for two-component regulatory system in virulence control of bacteria.
3. 学会等名 The third Makassar International Symposium on Pharmaceutical Sciences. (インドネシア)(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白土明子
2. 発表標題 細菌の環境感知と感染の調節.
3. 学会等名 2017年度日本農芸化学会東北支部シンポジウム「多様な広がりで魅せる微生物研究」. (弘前)(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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			
韓国	釜山大学	ソウル大学		
インドネシア	ハサヌディン大学			
スウェーデン	カロリンスカ研究所			