

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 Shib Shankar Saha

題 目 : **Analysis of molecular mechanism of *Francisella* pathogenesis using mouse and silkworm infection model**

(マウスおよびカイコモデルを用いた野兎病菌の病原性分子メカニズムの解析)

論文要旨 :

The zoonotic disease ‘tularemia’ is caused by CDC declared Tier-1 threat agent, *Francisella tularensis*. Only 10 *Francisella* can infect humans. It enters into the host such as mammals, birds, reptiles and fish through ingestion or inhalation of contaminated food and water, direct contact of infected animal, and through insect bite. After entering into host, phagocytes induce respiratory bursts to kill the pathogen, resulting generation of reactive oxygen species (ROS) like H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HClO. Upon oxidation of macromolecules, methionine, the most vulnerable amino acid under oxidative stress, is converted into methionine sulfoxide (MetO), which cannot perform normal cellular functions. Oxidation of methionine results in two diastereomeric forms of MetO: methionine-(S)-sulfoxide (Met-S-SO) and methionine-(R)-sulfoxide (Met-R-SO). Antioxidant enzyme, methionine sulfoxide reductase (Msr) converts oxidized methionine into free form of methionine very specifically; Msr encoded by *msrA* and *msrB* catalyze the Met-S-SO and Met-R-SO, respectively. *F. tularensis* carries *msrA*, *msrB* and *msrA/B* in different parts of its chromosome. In this study, role of *msrA* and *msrB* of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS strain have been investigated by mutant analysis approach in mouse infection model.

For methionine sulfoxide reductase assay, *msrA* and *msrB* mutants were generated by Targetron<sup>®</sup> gene knock out system and compared the phenotypic characteristics with wild-type strain. The results showed that deletion of *msrB* ( $\Delta msrB$ ) in *F. tularensis* causes increased susceptibility to exogenous oxidative stress like H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and t-butyl hydroperoxide. In mouse macrophages (J774) infection assay, significantly decreased growth was observed in case of  $\Delta msrB$  at 48 and 72 hours of post infection compared to parental strain, which was further confirmed in confocal microscopy. Attenuated growth of  $\Delta msrB$  was also observed in mouse infection assay. In contrast,  $\Delta msrA$  showed the phenotype as like as wild type. Double deletion mutant ( $\Delta msrA \Delta msrB$ ) showed similar characteristics as of *msrB* mutant. These results suggest that MsrB of *Francisella* has an anti oxidative function both *in vitro* and *in vivo* experiment. Among three *msr*, phenotypic characteristics of *msrA* and *msrB* have been analyzed in this study, for understanding detail mechanism of compete Msr system of *Francisella*, anti oxidative role of the rare form of *msr*, bifunctional *msrA/B*, which is present

in *Francisella* genome, need to be investigated. Interaction of three *msr* of *Francisella* may reveal some insights of methionine sulfoxide reductase system that would be a future research topic.

Mouse is widely accepted as an ideal mammalian model for *Francisella* research, but for large scale animal experiment, it raises cost and ethical issues. Identification of novel virulence factor, evaluation of gene functions, and assessments of therapeutic effects of drug using silkworm (*Bombyx mori*) infection model is one of the tools for infectious diseases experiment. *Francisella novicida*, which is virulent in mice but non-pathogenic to immunocompetent humans, is widely used as a potential surrogate organism for *Francisella* research. In this study, a novel silkworm model for *F. novicida* research was established.

For development of silkworm infection model, day 2 fifth instar larvae were infected by inoculating the hemocoels of silkworms with *F. novicida*. It killed silkworms within 3–7 days of post infection. To identify virulence factor, type VI secretory system of *Francisella* was selected, and for study, DotU, the core part of type VI secretion system was disrupted for construction of *dotU* deletion mutant ( $\Delta dotU$ ). Upon infection,  $\Delta dotU$  failed to kill silkworm, and bacterial load of  $\Delta dotU$  was significantly lower than that of the wild-type strain in whole silkworm body CFU count assay; whereas DotU complemented strain restored phenotypic virulence as like its parental strain. *F. novicida* could grow in different body tissues, approximately 10-fold increase in bacterial count was recorded in hemolymph and subcutaneous tissues compared with that in the silk gland, Malpighian tubule, and reproductive organs; the CFU count of  $\Delta dotU$  strain showed similar results in all organs as like whole body CFU count assay. Confocal microscopy further confirmed the arrested growth of the mutant strain within hemocytes of silkworm. The intracellular growth of *F. novicida* strains was also analyzed using the silkworm ovary-derived cell line BmN4, here, CFU count assay revealed extensive growth of the wild-type strain compared with that of the mutant strain; confocal microscopic data also confirmed the results. DotU of *Francisella*, the known virulence factor in case of human, found as a lethal pathogenic factor in our newly developed silkworm infection assay; therefore, this silkworm infection model is claiming as a useful non mammalian infection model for *Francisella novicida* pathogenesis study.

Taken together, this study was started with investigation of molecular mechanism of methionine sulfoxide reductases system of *Francisella* in mouse infection model, and found contributory role of MsrB in oxidative stress assay; considering expenses and ethical issues of mouse infection assay, research plan was redesigned for development of cheap and non mammalian infection model of *Francisella*, and finally succeeded in case of silkworm for *F. novicida* infection.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Shib Shankar Saha
審査委員	主査：山口大学 教授 度会 雅久
	副査：山口大学 教授 島田 緑
	副査：JRA 競走馬総合研究所 研究役 丹羽 秀和
	副査：山口大学 准教授 清水 隆
	副査：鹿児島大学 准教授 安藤 匡子
題目	Analysis of molecular mechanism of <i>Francisella</i> pathogenesis using mouse and silkworm infection model (マウスおよびカイコモデルを用いた野兎病菌の病原性分子メカニズムの解析)
審査結果の要旨： 野兎病菌( <i>Francisella tularensis</i> )は、グラム陰性の非運動性の小桿菌であり、野兎病を引き起こす。野兎病菌は自然界において、マダニ類などの吸血性節足動物を介して、主に野兎や齧歯類などの野生動物の間で維持されている。本来は野生動物の疾病であり、感染源の多くは野兎であるが、種々の哺乳類や鳥類などからの人への感染もある。国外では汚染された河川水や井戸水による経口感染や病原体を含む塵埃の吸入による呼吸器感染も報告されている。野兎病の症状は、インフルエンザ様の発熱、悪寒、頭痛、倦怠感のほか、感染経路によって様々な症状を呈する。リンパ節型とチフス型があり、通常ヒトからヒトへの感染はない。野兎病菌はマクロファージなどの食食細胞内で増殖する細胞内寄生菌である。本研究では野兎病菌の感染機構を解明する目的で、マウスおよびカイコを用いた感染モデル系を用い、感染に関与する菌側因子の解析を行った。 1) <i>msrA</i> および <i>msrB</i> の欠損株のマウスモデルにおける性状 食食細胞は菌を取り込んだ後、呼吸バーストを引き起こし、強力な抗菌作用を持つ過酸化水素や他の活性酸素種が生成される。活性酸素種と塩素は細胞成分に損傷を与え、それは細胞死につながりかねない。こうした損傷によって、タンパク質中ではイオウ含有アミノ酸であるメチオニンがメチオニンスルホキシドに変換され、生物活性を失う原因となることがある。メチオニンスルホキシド残基の生じたタンパク質を救済するために、生きた細胞では、細胞質、ミトコンドリア、葉緑体などのほとんどの細胞内区画でメチオニンスルホキシド還元酵素 (methionine sulfoxide reductase ; <i>Msr</i> ) が発現されている。本研究では野兎病菌が発現する <i>MsrA</i> および <i>MsrB</i> が感染に与える影響について、マウスモデルを用いて解析を行った。 野兎病菌の弱毒生ワクチン株として用いられている LVS 株 (BSL 2 レベル) を親株として、	

*msrA* および *msrB* の欠損株を Targetron gene knockout system を用いて作製した。*msrB* の欠損株は LVS 株と比べ過酸化水素と t-ブチルヒドロペルオキシドに対する感受性が増加した。マウスマクロファージ株 J774 において、*msrB* の欠損株は LVS 株と比べ細胞内増殖能が低下した。また、マウス体内における増殖も低下することが示された。一方、*msrA* の欠損株ではこれらの病原性の低下は認められなかった。*msrA* と *msrB* の両遺伝子の欠損株の性状は、*msrB* の欠損株の性状と一致した。

## 2) カイコ感染モデルを用いたノビシダ菌の感染

野兔病菌の類似菌であるノビシダ菌(*Francisella novicida*)は野兔病菌と遺伝学的な相同性が高く、細胞内寄生菌であり、病原性も類似している。しかし、人への病原性が低いことから BSL2 に分類されているため、野兔病菌の細胞内増殖機構の解析モデル菌株として一般的に使用されている。野兔病菌はカイコに共生することが先行研究で示されている。一方、ノビシダ菌をカイコに感染させると、感染後 3～7 日で死亡することが認められた。ノビシダ菌はカイコの全身の臓器に部分し増殖が認められ、4 型分泌機構の変異株では増殖が認められなかった。野兔病菌とノビシダ菌は動物細胞内では同様の挙動を示すが、昆虫内では異なることが明らかとなった。野兔病菌の生態を解明する上で有用な結果が得られた。

以上により、審査委員一同は博士(獣医学)の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。