

Abstract of Doctoral Thesis

Name Dhandy Koesoemo Wardhana

Title: Study on the identification and characterization of virulence determinants of *Francisella novicida*
(フランシセラ・ノヴィシダの病原性決定因子の同定と特徴付けに関する研究)

Abstract of thesis:

Francisella tularensis is a highly infectious Gram-negative bacterium that causes tularemia, a zoonosis affecting humans and animals. *F. tularensis* is a dangerous pathogen that can incur a high risk of morbidity and mortality. *F. tularensis* causes typhoidal and pneumonic systemic tularemia, which has a fatality rate of up to 60%. Therefore, *F. tularensis* is classified as a Category A biological threat agent. *F. tularensis* is further divided into four subspecies: *tularensis* (type A), *holarctica* (type B), *mediasiatica*, and *novicida*. Among them, *F. tularensis* subsp. *tularensis* and *F. tularensis* subsp. *holarctica* exhibit the highest virulence in humans and are responsible for the majority of tularemia cases. Due to its high infectivity and potential for airborne spread, *F. tularensis* has been developed and stockpiled as a biological warfare agent by several nations.

F. tularensis subsp. *novicida* (*F. novicida*) is considerably less virulent than *F. tularensis*, it is commonly used as a surrogate strain for virulent *F. tularensis*. In contrast to *F. tularensis*, *F. novicida* is an opportunistic pathogen that causes illness and even death in debilitated or immunocompromised patients but not in healthy individuals. *F. novicida* shares many characteristics with Type A strains of *F. tularensis*, showing similarities in the genome sequence, intracellular life cycle, and mechanisms of infectivity, including rapid phagosomal escape followed by vigorous cytosolic replication. It also infects macrophages, causing disease in mice. However, due to its lower virulence in humans, it can be safely handled under Biosafety Level 2 laboratory conditions and is a suitable model organism for studying *F. tularensis* infection.

In this study, I used HeLa cells expressing FcγRII (HeLa-FcγRII) to screen a transposon mutant library of *F. novicida* to isolate mutants that were less cytotoxic. HeLa-FcγRII cells are an epithelial cell line that expresses the FcγRII receptor, enabling efficient uptake of IgG-opsonized bacteria. This cell has the potential to enhance the efficiency of cell-based infection assays, such as large-scale genetic screening, and to offer novel insights into *Francisella* infection in epithelial cells, which has been difficult to analyze in phagocytic cells. I have screened 2,232 transposon mutants of *F. novicida* to find less cytotoxicity strains in the HeLa-FcγRII cells. 13 strains of transposon mutants were isolated as less cytotoxic, as confirmed by LDH cytotoxicity assay, and the transposon insertion sites were subsequently identified by sequencing analysis. Two mutants involved the same gene, *slt*. The others are *figE*, *fopA*, *iglC*, *igID*, *iglF*, *iglI*, *pdpB*, *pdpA*, *ampG*, *wbtF*, and one unnamed gene (*FTN_0096*).

Chapter one of the study describes about *FTN_0096* gene, focus on the identification and functional

analysis of *FTN_0096*, a gene identified through our screening of 2,232 transposon mutants of *F. novicida*. This research aims to elucidate the role of *FTN_0096* in intracellular replication and host responses. *F. novicida* wild-type (WT) strain and *FTN_0096* mutant were used to infect the HeLa–FcγRII and THP-1 cells, and then compared the results. WT strain proliferated intracellularly well 12–48 h post-infection. In contrast, the *FTN_0096* mutant proliferated intracellularly until 12 h post-infection but decreased at 24 and 48 h post-infection in both cells. The WT strain can escape from phagolysosomes, and the *FTN_0096* mutant cannot escape from phagolysosomes in the initial phases of infection. A successful escape from phagolysosomes into the host cytosol is essential for intracellular replication and the induction of cytotoxicity. Moreover, the *FTN_0096* of *F. novicida* associates with mitochondria and the Golgi complex during infection. These findings indicate the importance of *FTN_0096* of *F. novicida* for intracellular replication in the cells.

Chapter two of the study focused on the identification and functional analysis of *wbtF* gene. WT strain and *wbtF* mutant were used to infect the HeLa–FcγRII and THP-1 cells. In this study, intracellular replication of the WT strain increased at 12–48 h after infection. The *wbtF* mutant underwent intracellular replication for up to 12 h, then decreased at 24 and 48 h after infection in both cells. The WT strain can escape from phagolysosomes, but the *wbtF* mutant could not escape from phagolysosomes in the initial phases of infection and was digested within the lysosome. The *wbtF* mutant was also detected in the mitochondria and the Golgi complex. Infection of THP-1 cells with WT, *wbtF* mutant, and the complemented strain produced similar TNF- α and IL-6 responses, indicating that *wbtF* does not significantly affect cytokine production. These findings indicate that *wbtF* is important for the intracellular replication of *F. novicida*.

In conclusion, both *FTN_0096* and *wbtF* mutants exhibited significantly reduced intracellular replication in HeLa–FcγRII and THP-1 cells compared with the WT strain. These mutants also exhibited impaired escape from phagolysosomes during the early stages of infection, resulting in their retention and degradation within lysosomal compartments. *FTN_0096* and *wbtF* are also associated with organelles such as mitochondria and the Golgi complex. Thus, it may be a potential target for controlling *Francisella* infection.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	DHANDY KOESOEMO WARDHANA
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 度会 雅久
	副 査：JRA 日高育成牧場 上席調査役 丹羽 秀和
	副 査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査：鹿児島大学 准教授 松本 裕介
	副 査：山口大学 准教授 清水 隆
題 目	Study on the identification and characterization of virulence determinants of <i>Francisella novicida</i> (フランシセラ・ノヴィシダの病原性決定因子の同定と特徴付けに関する研究)
審査結果の要旨： 野兎病菌 (<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>) は、グラム陰性の通性細胞内寄生菌であり、人獣共通感染症である野兎病の原因菌である。野兎病菌は自然界においては野ウサギやげっ歯類によって保有されており、同時に節足動物からも分離されることから、主に哺乳類を中心とする野生動物と節足動物によって生活環が維持されていると考えられている。野兎病菌の類縁菌で環境中に存在するフランシセラ・ノヴィシダ (<i>Francisella novicida</i>) は人へ対する病原性は低いが、野兎病菌と遺伝的相同性が高いため野兎病菌の代替モデル菌として研究されている。本研究では <i>F. novicida</i> を用いて病原性決定因子の同定とその機能解析を行った。 1. 細胞内増殖および宿主応答に関与する因子としての <i>Francisella novicida</i> FTN_0096 の同定 野兎病菌は通常、マクロファージ系細胞に感染するが、上皮系細胞への感染効率は高くない。マクロファージ系細胞は一般的に遺伝子ノックダウンの効率が低く、宿主細胞側因子の解析を行う上で問題がある。これを解消するために抗 <i>F. novicida</i> 抗体を含むマウス血清を添加した <i>F. novicida</i> を用いて、Fc 受容体を発現する HeLa 細胞 (HeLa-Fc γ RII 細胞) への感染モデル系を確立した。HeLa-Fc γ RII 細胞への細胞傷害性が低い菌株を分離するため、<i>F. novicida</i> のトランスポゾン変異体 2,232 株をスクリーニングし、13 株を単離した。トランスポゾン挿入部位の配列解析により、FTN_0096 を含む 13 個の遺伝子が同定された。野生株は HeLa-Fc γ RII 細胞および THP-1 細胞で増殖したが、FTN_0096 変異株の細胞内増殖能は低下した。FTN_0096 変異株は感染初期にファゴリソソームから逃れることができず、さらにミトコンドリアおよびゴ	

ルジ体と同位置に FTN_0096 変異株が検出される。これらの結果は、*F. novicida* における FTN_0096 が細胞内増殖に重要であることを示唆している。

2. *Francisella novicida* 感染における細胞毒性関連因子としての *wbtF* 遺伝子の同定

HeLa-Fc γ RII 細胞を用いた新規感染モデルを用いて、分離された細胞障害性の低下した *F. novicida* のトランスポゾン変異株、全 13 株についてトランスポゾン挿入部位を解析し、菌の細胞毒性に関与する遺伝子の同定を行った。その結果、*figE*、*slt*、*fopA*、*iglC*、*igID*、*iglF*、*iglI*、*pdpB*、*pdpA*、*ampG*、*wbtF*、および第 1 章で解析した未命名遺伝子 1 個 (FTN_0096) であることが明らかとなった。第 2 章では *wbtF* 遺伝子に注目し解析を行った。野生型株は HeLa-Fc γ RII 細胞および THP-1 細胞において細胞内増殖を示したが、*wbtF* 変異株の細胞内増殖能は低下した。*wbtF* 変異株は感染初期にファゴリソソームから逃れることができず、リソソーム内で消化された。また、*wbtF* 変異体はミトコンドリアおよびゴルジ体と同位置に検出された。*wbtF* 変異株によって誘導されるサイトカイン応答は、野生株のものと同等であった。これらの結果は、*wbtF* が *F. novicida* の細胞内増殖に重要であることを示唆している。本研究により開発された *F. novicida* と HeLa-Fc γ RII 細胞を用いた感染モデル系は野兎病菌の病原因子の解析に有用であることが示された。

以上により、審査委員一同は本論文が博士 (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。