

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19101

研究課題名(和文)百日咳菌の自己凝集能に関する研究

研究課題名(英文)Fim3-mediated autoagglutination of Bordetella pertussis

研究代表者

大塚 菜緒(Otsuka, Nao)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号：90596610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では百日咳菌(*Bordetella pertussis*)の自己凝集の原因および病原性について解析を行った。百日咳菌自己凝集株と自己凝集消失株の全ゲノム比較および百日咳菌臨床分離株におけるFim3イムノブロット解析により、百日咳菌の自己凝集はFim3の高産生により引き起こされることが明らかとなった。マウス鼻腔感染実験による病原性解析では、*in vitro*で自己凝集を引き起こすほどのFim3産生量であっても、*in vivo*では肺接着に有利に働くことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bordetella pertussis is the etiologic agent of whooping cough. It was known that some B. pertussis isolates cause auto-agglutination (Agg) *in vitro*, however the cause of Agg has not been elucidated. In this study, whole genome sequencing and immunoblot analysis of Agg and non-Agg isolates revealed that highly production of type 3 fimbriae (Fim3) is the main cause of Agg. On the other hand, Agg isolate (Fim3 high production) showed significantly higher ability of lung adhesion than non-Agg strains (fim3-deficient or Fim3 low production strains) in mouse adherence assay, indicating that highly Fim3 production has benefit for *in vivo* adherence.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳菌 自己凝集 線毛

1. 研究開始当初の背景

百日咳は主に百日咳菌 *Bordetella pertussis* によって引き起こされる急性呼吸器感染症である。百日咳菌は百日咳毒素 (PT)、繊維状赤血球凝集素 (FHA)、パータクチン (PRN)、線毛 (Fim) など様々な病原因子を産生する。百日咳はワクチン予防可能疾患 (VPDs) の一つとされ、百日せきワクチンの導入により患者数が激減した。しかし近年、ワクチン接種率の高い先進諸国で再び大規模な百日咳流行が繰り返し報告されている。世界で流行している百日咳菌はこの 20 年間に急速な遺伝子変異が進行しており、特に上記の病原因子をコードする遺伝子に変異の集積がみられている。国内流行株においても、病原関連遺伝子がワクチン株のものとは異なる遺伝子型に変化してきており、こうした遺伝子変異が近年の百日咳再興の一因であると指摘されている。

百日咳菌の最も簡便な同定方法は、抗百日咳菌血清を用いたスライド凝集法である。同法では分離菌を生理食塩水に懸濁して用いるが、臨床分離株の中には自己凝集を示す菌株が存在することが以前から病院検査室などでは知られていた。国内臨床分離株の自己凝集能を調べてみると、2000 年頃から分離率が上昇しており、近年の百日咳菌遺伝子変化との関連が疑われた。

我々は、まず自己凝集の要因を特定するために、百日咳菌自己凝集株から継代培養を繰り返すことで、遺伝子組換え技術を用いることなく自己凝集消失株を分離した。次に、両株の違いが自己凝集の有無に関連すると考え、親株と変異株の膜タンパク質を SDS-PAGE により比較解析したところ、変異株では約 20kDa のタンパク質産生が消失していた。当該タンパク質を質量分析に供したところ、百日咳菌の線毛タンパク質 Fim3 であることが判明した。これより、百日咳菌の自己凝集の要因が Fim3 産生にあると推測されたが、実際に臨床分離株の線毛産生を調べてみると、Fim3 を産生しながらも自己凝集を示さない株が存在した。したがって、Fim3 の存在は自己凝集と一定の関連があると考えられたが、さらに他の因子の関連が示唆される結果となった。

2. 研究の目的

自己凝集を示す大腸菌、エルシニア菌、カンピロバクター属菌など他の細菌では、強い病原性との関連も指摘されており、百日咳菌における自己凝集の要因および病原性との関連を解明することは重要であると考えられた。

本研究では、Fim3 の産生以外に百日咳菌の自己凝集を引き起こす因子を、全ゲノム比較を中心とした網羅的解析により特定する。さらに、*in vitro* で見られる自己凝集が生体内でどのように病原性に関連するのかについて、マウス鼻腔感染モデルを用いた接着実験に

より解析する。

3. 研究の方法

(1) 百日咳菌の培養：百日咳菌は Cyclodextrin solid medium (CSM) 培地または Bordet Gengou (BG) 寒天培地を用いて、36°C で培養した。また、必要に応じて培地に 20 µg/ml ストレプトマイシン (Sm) を添加した。

(2) 自己凝集測定：百日咳菌懸濁液を 1cm path キュベットに入れ、36°C で静置した。OD650 nm の吸光度を測定し、5 時間以内に 40% 以上の濁度低下が認められた場合、自己凝集能ありと判定した。

(3) 全ゲノム解析：illumina miseq および PacBio RSII により百日咳菌 BP300、300s の全ゲノム配列を決定した。ゲノムの比較解析には MUMmer v3.23 および Mauve v2.4.0 を使用した。

(4) 遺伝子破壊および相補：*fim3* 遺伝子破壊は Gateway cloning system (invitrogen) を用いて行った。まず、全長 615 bp の *fim3* 遺伝子のうち、393 bp を欠損するようデザインしたフラグメントを有する pDONR221 を作製し、LR Clonase II 酵素の働きにより pABB-CRS2 にフラグメントの載せ替えを行った (pABBΔ*fim3*)。このプラスミドをエレクトロポレーションにより大腸菌 SM10λpir に導入した。一方、百日咳菌 BP300 を Sm 含有 BG 培地に播種し、Sm 自然耐性を付与した BP300Sm を得た。接合反応により pABBΔ*fim3* を大腸菌 SM10λpir から百日咳菌 BP300Sm に導入した。その後、2 回の相同組換えにより BP300Sm の *fim3* 遺伝子が Δ*fim3* に組み換わった。遺伝子破壊は DNA シーケンシングおよび Fim3 イムノプロットにより確認した。*fim3* および *fim2* 遺伝子の相補は、各遺伝子を発現している菌株のゲノム DNA を鋳型として、それぞれ 250 bp および 170 bp 上流から PCR クローニングを行った。PCR フラグメントは発現ベクター pRK415 に組み込み、これを大腸菌 DH5α に導入した。ヘルパープラスミドを有する大腸菌 DH5α/pRK2013 存在下で、DH5α/pRK-*fim3* または pRK-*fim2* と百日咳菌 BP300SmΔ*fim3* を接合反応させ、BP300SmΔ*fim3* に pRK-*fim3* または pRK-*fim2* を導入した。

(5) 抗原産生解析：百日咳菌の抗原産生はイムノプロット法により解析した。Fim2 および Fim3 の検出にはウサギ抗 Fim3 または抗 Fim2 IgG 抗体 (3000 倍希釈, Cusabio, China) を用いた。RNA ポリメラーゼサブユニット α (RpoA) の検出にはマウス抗 *E. coli* RpoA IgG 抗体 (1000 倍希釈, BioLegend, USA) を用いた。2 次抗体には抗マウスまたはウサギ IgG-HRP 抗体 (3000 倍希釈) を使用した。化学発光は Western Lightning ECL Pro (PerkinElmer) を用いて行い、ルミノイメージアナライザー LAS-3000 (FUJIFILM) にて検出した。

(6) マウス *in vivo* 接着実験：6 週齢の BALB/c マウス (メス) に約 10⁶ CFU/ml に調製した百日咳菌を 50 µl 経鼻感染させ、感染 2 時間後

に肺を摘出した。1群10匹のマウスを使用し、5匹はコントロール群、残り5匹は肺胞洗浄群とした。コントロール群は摘出した肺を10ml PBSでホモジナイズした。一方、肺胞洗浄群は、マウスから気管ごと肺を摘出したのち、これにシリンジを連結させ、1ml PBSで肺胞洗浄を行った。得られた肺胞洗浄液には、洗浄により肺組織から遊離した百日咳菌が回収される。肺胞洗浄後の肺はコントロール肺と同様に10ml PBSでホモジナイズした。コントロール肺、肺胞洗浄液、肺胞洗浄後の肺に含まれる百日咳菌量は、各検体からQIAamp microkit (QIAGEN)によりDNAを抽出し、IS481をターゲットとしたリアルタイムPCR法により定量した。

(6)統計処理：マウス感染実験における各群の菌量比較はMann-Whitney検定により行い、 $P < 0.05$ の場合有意であると判定した。統計計算にはGraphPad Prism ver.7.0を用いた。

4. 研究成果

(1)自己凝集能の測定：国内で臨床分離された百日咳菌株の自己凝集能を測定した。5時間の測定時間中、全く自己凝集を起こさない株（非自己凝集株）とOD650 nmが1.0から0.4以下にまで減少する株（自己凝集株）が認められた（図1A）。自己凝集の程度には株によるバラツキがあり、もっとも強い自己凝集株では、静置20分以内にOD650 nmが0.3以下にまで低下した（図1B）。

(2)自己凝集要因の網羅的解析：強い自己凝集を示す百日咳菌BP300から継代により自己凝集消失株を得た(BP300s)。両株の全ゲノム配列を決定し、ゲノム配列の比較を行なった。その結果、BP300sでは線毛3(Fim3)をコードする*fim3*遺伝子およびRNAポリメラーゼ α サブユニット(RpoA)をコードする*rpoA*遺伝子のプロモーター領域にそれぞれ1塩基欠損および1塩基置換が生じていることが判明した。*fim3*および*rpoA*の発現をリアルタイムPCRで測定すると、BP300と比較してBP300sでは*fim3*発現が有意に減少していた。一方、*rpoA*発現は両株で有意差がなかった。イムノプロットの結果も同様に、BP300sではFim3が検出されなかったが、RpoAはBP300、BP300sで同程度の産生が検出された。したがって、自己凝集に与える因子としてFim3が示唆された。

(3)*fim3*遺伝子の破壊・相補と自己凝集：全ゲノム解析によりFim3が自己凝集の原因であることが示唆された。これを実験的に証明するため、自己凝集株の*fim3*遺伝子破壊および遺伝子相補を行い、得られた菌株における自己凝集能を測定した（図2）。親株には百日咳菌BP300にストレプトマイシン自然耐性を付与したBP300Smを選択した。BP300SmはBP300と同程度の強い自己凝集能を有する。BP300Smの*fim3*遺伝子を破壊したBP300Sm Δ *fim3*は自己凝集能を失ったが、*fim3*遺伝子のプラスミド相補により自己凝集

能が復帰した。国内臨床株では*fim3*遺伝子型に*fim3A*および*fim3B*の2つの主要アレルタイプが存在するが、アレルタイプの違いは自己凝集能に影響を与えなかった（BP300Sm Δ *fim3*/pRK-*fim3A*, *fim3B*）。BP300Smは線毛2(Fim2)をコードする*fim2*遺伝子を有するがFim2産生はしていない。そこで、BP300Sm Δ *fim3*株にプラスミドにより*fim2*遺伝子を相補してFim2の自己凝集への影響を調べたところ、自己凝集は認められなかった。このことより、線毛Fim2は自己凝集を引き起こす性質を有さないことが指摘された。

(4)Fim3産生量と自己凝集：本研究以前に明らかにしていた通り、ゲノム解析においても自己凝集の原因としてFim3が特定された。百日咳菌臨床分離株ではFim3を産生しながらも自己凝集を示さない株が存在する。そこで産生量の違いを明らかにするため、イムノプロット解析によりFim3産生量を比較した（図3）。イムノプロット解析により自己凝集株(Agg+)では非自己凝集株(Agg-)に比べて、Fim3産生量が有意に高いことが判明した。すなわち、百日咳菌自己凝集にはFim3産生が必須であるが、その産生量が高い場合のみ自己凝集が引き起こされるということが判明した。なお、自己凝集株、非自己凝集株でPTおよびFHAの産生量は有意差が認められなかった。

(5)自己凝集と病原性：百日咳菌BP300SmはCSM培地で培養するとFim3を高産生し、自己凝集を起こすが、BG培地で培養した場合その産生量が低下し、自己凝集を起こさない。また、BP300Sm Δ *fim3*は*fim3*遺伝子の破壊により、Fim3を産生せず、自己凝集も引き起こさない。百日咳菌の自己凝集能およびFim3産生量とin vivoにおける病原性の関係性を明らかにするため、上記3群を用いてマウス肺への接着能比較を行った（図4）。なお、各群における百日咳菌量は生菌数でカウントした場合、自己凝集によりBP300Sm-CSM群のコントロールが他群に比べて有意に少なく算出されたため、百日咳菌DNA量で比較した。肺胞洗浄液に含まれる菌量は、BP300Sm-CSMと比較して、BP300-BGおよびBP300Sm Δ *fim3*-CSMで有意に多く、Fim3を高産生するBP300Sm-CSMはマウス肺組織に強く接着していることが示された。このことより、in vitroで自己凝集を引き起こすほどのFim3を高産生していても、in vivoでは接着に有利に働くことが示唆された。ただし、本実験では肺胞洗浄後の肺に含まれる百日咳菌量が、3群で有意差が認められなかったことから、感染菌量が過剰であった可能性が考えられた。

以上のことから、百日咳菌の自己凝集は線毛Fim3の高産生によって引き起こされ、*fim3*遺伝子のアレルタイプはFim3産生量および自己凝集の程度に影響しないことが明らか

となった。また、in vitro で自己凝集を引き起こすほど Fim3 を高産生しているにもかかわらず、in vivo での接着には有利に働くことが示唆された。今後、自己凝集株分離率の経年変化や Fim3 高産生の機構について詳細な解析を加える予定である。

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1件)

Otsuka N, Guiso N, Bouchez V. The length of poly(C) stretch in the *Bordetella pertussis* Pfim3 promoter determines the *vag* or *vrg* function of the *fim3* gene. *Microbiology* 2017;163:1364-1368.

〔学会発表〕(計1件)

大塚菜緒、平松征洋、蒲地一成、柴山恵吾. Fimbriae-mediated autoagglutination of *Bordetella pertussis*. 第89回日本細菌学会総会. 2016年3月大阪.

〔図書〕(計1件)

大塚菜緒, 蒲地一成. フォーラム: 百日咳の国際動向と検査法・ワクチンの問題点. 感染・炎症・免疫 2015;45:46-56.

〔産業財産権〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚菜緒 (OTSUKA, Nao)

国立感染症研究所細菌第二部・主任研究官

研究者番号: 90596610

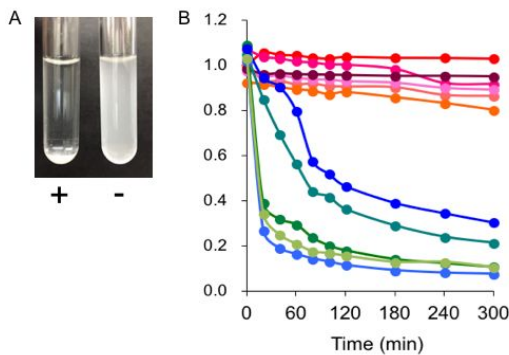


図1. 百日咳菌の自己凝集測定

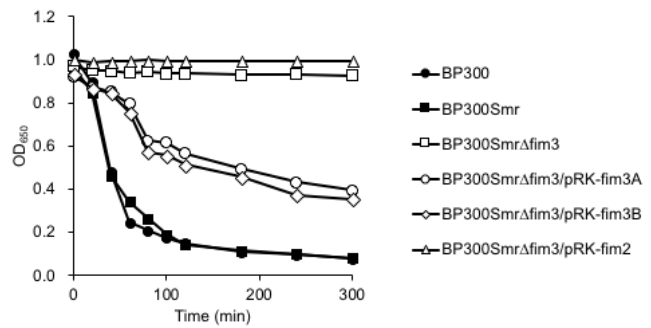


図2. *fim3* 遺伝子の破壊・相補と自己凝集

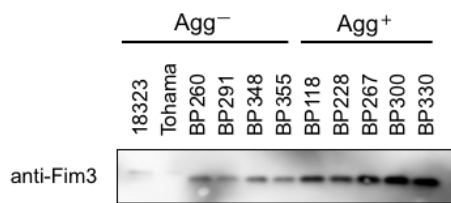


図3. 百日咳菌の非自己凝集株(Agg⁻)と自己凝集株(Agg⁺)における Fim3 産生量の比較

シンボル	菌株-培地	Fim3産生量	自己凝集
●	BP300Sm-CSM	+++	+
■	BP300Sm-BG	+	-
▲	BP300SmΔfim3-CSM	-	-

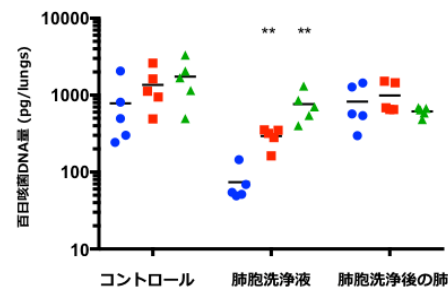


図4. 百日咳菌 Fim3 産生量と接着能の比較