

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19124

研究課題名(和文)百日咳における発作性咳嗽に関連する菌側遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of a bacterial contributor to coughing fits in whooping cough

研究代表者

中村 佳司(Nakamura, Keiji)

九州大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号：60706216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、百日咳の主症状である咳嗽発作を引き起こす原因因子(咳嗽因子)の同定を目指し、新たに発見された咳嗽発作に関連する細菌側の遺伝子(cough X: cx、仮称)の機能解析を行った。動物モデルを用いた解析の結果、cx遺伝子産物であるCXは感染宿主体内で咳嗽因子の発現を制御している可能性が高いことが分かった。さらに解析の過程で、既知の転写制御因子が培養液中で咳嗽因子の発現に関与している可能性を見出した。これらの制御因子の下流に存在する遺伝子群の中から、咳嗽因子の探索を行い、いくつかの咳嗽因子候補を見出した。今後これらを詳細に解析することで、咳嗽因子の特定が可能になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Whooping cough (pertussis) is a highly contagious bacterial respiratory infection, which is characterized by coughing of infected hosts. The causative agents and mechanism of the coughing remain unknown. In the present study, the gene cx (Cough X, a tentative name), which was newly found as one of bacterial factors associated with the coughing, was characterized. The coughing animal models with living bacteria or bacterial lysates indicated that the protein CX, which is the cx gene transcript, probably regulate expression of unknown bacterial causative agents in infected hosts. Moreover, these models revealed that another known bacterial regulator also controls the expression of the agents during in vitro culture. Several candidates causing the coughing were found by searching the downstream genes of the two regulators with the coughing animal models. Further analysis about these candidates potentially leads to identify the genuine bacterial coughing factors.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳 発作性咳嗽 気管支敗血症菌 実験動物モデル

### 1. 研究開始当初の背景

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の上部気道感染によって起こる伝染性の疾病である。本症は感染者に特徴的な発作性咳嗽を引き起こし、患者は無呼吸状態からチアノーゼや痙攣、さらには脳症を併発することもある。この発作性咳嗽の病態発生機構は未解明であるが、その理由のひとつとして、百日咳菌はヒトに特化した病原細菌であるため、百日咳症を再現する汎用性の高い動物感染モデルが成立しないことが挙げられる (文献 1)。

申請者らは、百日咳菌の産生する病原因子が菌感染の特異症状である咳嗽発作に関与するかどうかを調べるため、咳嗽発作の病態解析のできる感染動物モデルの確立を試みた。その結果、百日咳菌よりも広い宿主域を持つ気管支敗血症菌とある実験動物 (論文未発表のため、以降も実験動物として記載) の組み合わせで、少量菌数で一定期間感染が維持され、咳嗽発作を再現する動物感染モデルを作成することに成功し、さらにビデオレコーダーとその解析コンピューターソフトを用いて咳嗽発作の定量化観察のプロトコルを確立した。この感染動物モデルの信頼性を検証する目的で、種々の気管支敗血症菌株による感染実験を繰り返した。その過程で、感染は成立するが咳発作を起こさない気管支敗血症菌の変異株 (A 株) を偶然に分離することができた。野生株と A 株の全ゲノム配列を解析した結果、A 株の *cx* (Cough X、仮称) 遺伝子に 1 塩基の欠失のあることがわかった。そこで野生株の *cx* 遺伝子を人為的に欠損させると、野生株の咳嗽惹起能は著しく低下し、一方 A 株に野生型 *cx* 遺伝子を相補すると、菌の咳発作惹起能は回復した (図 1)。

*cx* 遺伝子は、感染宿主に咳を惹起するボルデテラ属細菌である百日咳菌、パラ百日咳菌、気管支敗血症菌全てのゲノムにおいて高度に保存されている。これらのことは、*cx* 遺伝子が百日咳症における咳発作の発症に関与していることを示唆している。一方これまでに、CX が菌体外に分泌 (放出) され、かつ菌体の下流遺伝子の発現に関与するという矛盾するような知見も得られており、CX の咳嗽発作に関与する機能は不明である。

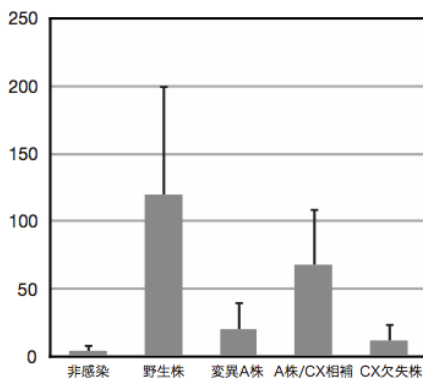


図1. 任意時間内での咳嗽回数

### 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、百日咳の主症状である発作性咳嗽の発症機構の解明を目指して、本症の原因因子を同定することにある。咳嗽発作に関連する細菌側の遺伝子として新たに見出した *cx* 遺伝子の詳細な機能解析を行い、その知見を通じて発作性咳嗽の発症機構の理解を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 気管支敗血症菌の変異株の作製

気管支敗血症菌の遺伝子欠失変異株は下記の Suicide vector を利用した相同組み替えによって作製した。既存の vector (文献 2) に、標的遺伝子の上流および下流領域約 1 kbp あるいは上流および下流領域の間にクロラムフェニコール耐性 (*cm<sup>r</sup>*) 遺伝子を組み込んだ領域を挿入し、組み換え後の変異株の標的遺伝子が in-frame deletion あるいは *cm<sup>r</sup>* 遺伝子に置換されるような vector を構築した。*cx* 遺伝子部分欠失変異株作製用の vector については以下の手順で作製した。*cx* 遺伝子およびその上流と下流約 1 kbp を含む領域を挿入した suicide vector をテンプレートとして、*cx* 遺伝子 (全長 576 塩基) の 3' 領域が増幅されず、252 番目の塩基直後に *cx* 遺伝子の終止コドンが含まれるようなプライマーを用いて inverse PCR を行った。PCR 産物のリン酸化およびセルフライゲーションにより、目的の領域を含む suicide vector を構築した。ボルデテラ属菌の主要な病原因子の発現制御に寄与する二成分制御系因子 BvgAS の恒常活性化株 (Bvg<sup>+</sup> 株) および不活性化株 (Bvg<sup>-</sup> 株) 作製の為の vector は既報に従って構築した (文献 3)。各 suicide vector を三親接合によって気管支敗血症菌へ移行させ、選択圧を利用した二段階の相同組み替えにより、目的の遺伝子欠失変異株を得た。

#### (2) 点変異 *cx* 遺伝子挿入ベクターの作製

気管支敗血症菌体内で維持されるプラスミド (文献 4) に気管支敗血症菌の既知の病原遺伝子である *cyaA* のプロモーター領域と *rrnB* ターミネーターを組み込み、2 つの領域の間に *cx* 遺伝子および *cx* 遺伝子と上流遺伝子の遺伝子間領域を挿入した。作製したプラスミドに対して、*cx* 遺伝子の開始コドンと推定される 2 箇所の ATG 配列のいずれかに点変異を導入した。これらのプラスミドを用いて、(1) によって作製した気管支敗血症菌 *cx* 遺伝子欠失変異株 ( $\Delta cx$  株) の形質転換を電気穿孔法によって行った。

#### (3) 気管支敗血症菌の感染による咳嗽発作の定量化観察

気管支敗血症菌 100-1000 CFU を含む培養液 10  $\mu$ l を、メドトミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの三剤により麻酔した実験動物の鼻腔内に接種した。接種後 3 日目から 12 日目まで、毎日 5 分間感染動物の様子をデ

デジタルビデオレコーダーで録画し、解析コンピュータソフトを用いて各撮影日の咳嗽の回数を計測した。6日目から11日目までの合計30分間の咳嗽の回数を集計し、感染動物の咳嗽発作回数とした。菌体接種15日後、実験動物の気管内に定着した気管支敗血症菌の菌体数を測定した。

#### (4) 気管支敗血症菌の菌体破砕液接種による咳嗽発作の定量化観察

気管支敗血症菌の菌体破砕液は以下の手順で調製した。培養液から集菌した気管支敗血症菌を超音波破砕機で破砕し、遠心上清をフィルター濾過することで生菌を完全に除去した破砕液を得た。この破砕液のタンパク質濃度を1 mg/mlになるように希釈し、イソフルランで麻酔した実験動物の鼻腔内に100  $\mu$ l 接種した。この破砕液調製と鼻腔内接種を5日間繰り返した後、初回接種後5日目から7日目に、接種動物の10分間の咳嗽の回数を計測し、合計30分間の回数を接種サンプルによる咳嗽発作とした。初回接種から7日後に、実験動物の気管内に気管支敗血症菌が定着していないことを確認した。

#### (5) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

NCBIに登録された気管支敗血症菌ゲノム上のCDSの塩基配列を元に60 bpのプロンプをデザインし、マイクロアレイ上にスポットした。気管支敗血症菌野生株および $\Delta cx$ 株、あるいはBvg<sup>+</sup>株およびBvg<sup>-</sup>株を培養し、total RNAを抽出した。Cy3あるいはCy5でラベルしたcDNAを合成し、マイクロアレイにハイブリダイズさせた。野生株と $\Delta cx$ 株、Bvg<sup>+</sup>株とBvg<sup>-</sup>株の間の各遺伝子の発現比を解析し、野生株/ $\Delta cx$ 株あるいはBvg<sup>+</sup>株/Bvg<sup>-</sup>株の発現強度比が2あるいは3以上となる遺伝子を選出した。

### 4. 研究成果

#### (1) *cx* 遺伝子開始コドンの決定

*cx* 遺伝子産物であるCXの翻訳開始コドンには2箇所の候補(図2、ATG1およびATG2)があり、これまで未確定であった。そこで $\Delta cx$ 変異株にそれぞれの開始コドンのATGをACGに点変異させた変異*cx*遺伝子をプラスミド相補し、各相補株におけるCXの発現をwestern blottingによって確認した(図2)。*cx* 遺伝子の2番目のATG(ATG2)をACGに変異させた遺伝子相補株において、CXの発現が確認されなかった。このことから、ATG1ではなくATG2が*cx* 遺伝子の本来の開始コドンであることが強く示唆された。

#### (2) CXの機能ドメインの推定

背景の項目で述べたように、実験動物に咳嗽発作を誘導しない気管支敗血症菌の自発性変異A株の*cx* 遺伝子には1塩基欠失によるフレームシフト変異が起こっていた(図3)。そこで、欠失箇所に終止コドンを導入した部

分欠失*cx* 遺伝子を保有する気管支敗血症菌( $\Delta cx_{85-c}$ 株)を作製し、咳嗽発作惹起能を検討した。本菌株を感染させた動物の咳嗽発作を測定すると、A株や $\Delta cx$ 株と同様に、野生型と比較してその回数が減少していた。 $\Delta cx_{85-c}$ 株の気管支への定着の程度は野生型や $\Delta cx$ と比較して大差がなかった(data not shown)。このことから、少なくともCXのC末端領域が咳嗽発作の誘導に参与していることが示唆された。CXのN末端領域の関与や詳細な機能ドメインの決定についてはさらなる解析が必要であると考えられる。

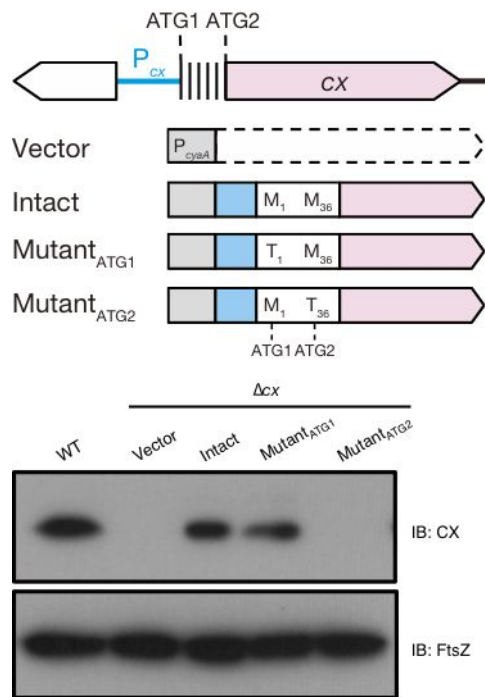


図2. *cx*遺伝子相補株におけるCXの発現。FtsZは内部標準として使用した。

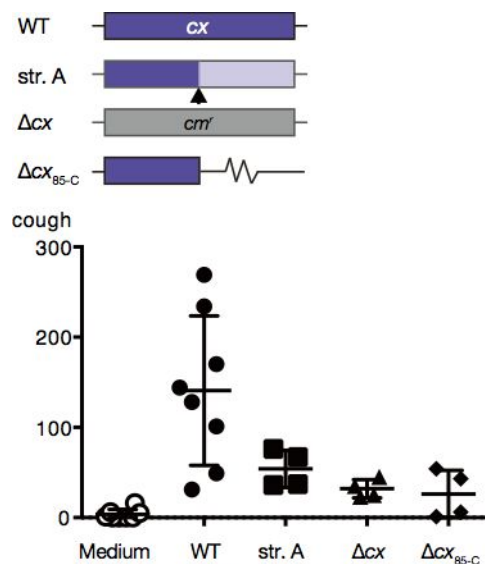


図3. N末端CX発現気管支敗血症菌( $\Delta cx_{85-c}$ )の実験動物に対する咳嗽発作惹起能。各菌株において感染動物の咳の回数、平均値、および標準誤差が示されている。

### (3) CX の咳嗽発作に対する直接的な影響の検討

これまでの研究結果から、実験動物に気管支敗血症菌の菌体破砕液を鼻腔内投与した場合も生菌投与と同様に咳嗽発作が起こり、56、60分間の処理(Heat-treated)を加えた破砕液ではこの作用が消失することが明らかになっている(図4)。CXは菌体外に分泌されるため、気管支敗血症菌体内で転写制御因子として機能しながら、感染宿主に対して直接咳嗽発作を誘導する可能性がある。そこで $\Delta cx$ 株の菌体破砕液を調製し、実験動物に接種した。 $\Delta cx$ の菌体破砕液は野生型と同程度に投与動物に咳嗽発作を引き起こした。また、CX組み換えタンパク質を発現する大腸菌の菌体破砕液は投与動物に咳嗽発作を引き起こさなかった(data not shown)。これらのことから、CXが咳嗽の直接原因である可能性が低いこと、試験管培養液中では感染動物体内とは異なり、CX以外に咳嗽発作の原因因子の発現制御機構が存在する可能性があることが示唆された。この一方で、Bvg株の破砕液は投与動物に咳嗽発作を引き起こさなかったことから、咳嗽発作の原因因子の試験管培養液中における発現がBvgASによって制御されている可能性が示唆された。CXと他の未知の因子との協調作用により咳嗽が引き起こされている場合、今回の実験ではCXの咳嗽への関与を見逃す可能性があるため、CXの咳嗽発作への影響に関してはさらに詳細な解析が必要である。しかしながら、本研究課題の最終的な目的は咳嗽発作の菌側因子の同定にあるため、CXは咳嗽因子の発現を制御することで咳嗽発作に関与するという仮説のもと、当初の計画を変更し、CXあるいはBvgASの下流にあると考えられる咳嗽因子の探索を行った。

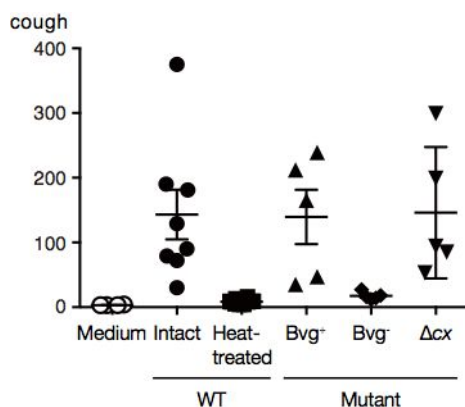


図4. 気管支敗血症菌体破砕液投与動物の咳嗽発作各菌株の菌体破砕液において接種動物の咳の回数、平均値、および標準誤差が示されている。

### (4) マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析と咳嗽発作関連遺伝子候補の選出

(3)で得られた結果について、菌体破砕液によって引き起こされる咳嗽発作の原因が、菌体感染と異なる場合、CXは培養菌体内においても感染時に誘導される真の咳嗽因

子の発現を制御している可能性がある。この仮定に基づき、BvgASによって制御される遺伝子に加えて、CXの下流で転写制御を受ける遺伝子もリストアップした。アノテーション情報から示唆される、代謝や転写制御に関連する遺伝子、BvgASに制御される咳嗽発作に関与しないことを確認したボルデテラ属菌の既知の主要病原遺伝子(data not shown)、および百日咳菌で保存されていない遺伝子は候補から除いた。最終的に、培養液中でCXあるいはBvgASの下流にある咳嗽発作候補遺伝子を20あるいは123選出した。これらの遺伝子に重複は見られなかった。

### (5) 咳嗽発作関連遺伝子の探索

(4)で得られた遺伝子のうち、CX下流の候補については全ての遺伝子、BvgAS下流の候補遺伝子についてはBvg+株とBvg-株の発現強度の差が大きい8遺伝子群(合計17遺伝子)のそれぞれを欠失させた気管支敗血症菌変異株を作製した。CX下流の候補遺伝子のうち、*creg* (Cough-related gene)と仮称した遺伝子を欠失した変異株を感染させた動物の咳嗽発作の回数は野生型と比較して減少していた(次項図5A)。一方で、 $\Delta creg$ の定着菌数は安定しておらず(data not shown)、咳嗽発作の減少の原因として $\Delta creg$ の気管定着能低下が関与している可能性も考えられた。さらに $\Delta creg$ の破砕液投与によって動物の咳嗽発作が惹起された(次項図5B)ことから、*creg*の咳嗽発作への影響については、解析する実験動物の数を増やしてさらに検証する必要があると考えられた。

Bvg下流の候補遺伝子のうち、*gene x1*および*x2*と仮称した遺伝子群を欠失した変異株( $\Delta x1x2$ )について、感染および破砕液接種動物の咳嗽発作の回数が野生型と比較していずれも減少していた(次項図5)。この変異株は実験動物の気管に安定して定着していた(data not shown)。このことから、*gene x1*および*x2*の遺伝子産物X1およびX2が咳嗽発作に直接的に関係している可能性が考えられた。感染と破砕液投与の両方で咳嗽回数が野生型と比較して減少する菌株が存在することから、 $\Delta cx$ の培養液中での発現制御は感染動物体内とは異なる可能性も示唆された。特に気管支敗血症菌の感染中における*cx*と*gene x1*あるいは*x2*との関係について詳細に解析する必要があると考えられた。

気管支敗血症菌染色体上において、*gene x1*および*x2*の遺伝子間領域は数十塩基程度であり(次項図6)、X1とX2との関係性については不明である。これらの遺伝子が咳嗽発作にどのように関係しているのかも含めて、遺伝子産物の機能解析を詳細に行うことにより、咳嗽発作を引き起こす菌体側の原因因子の特定につながると考えられた。

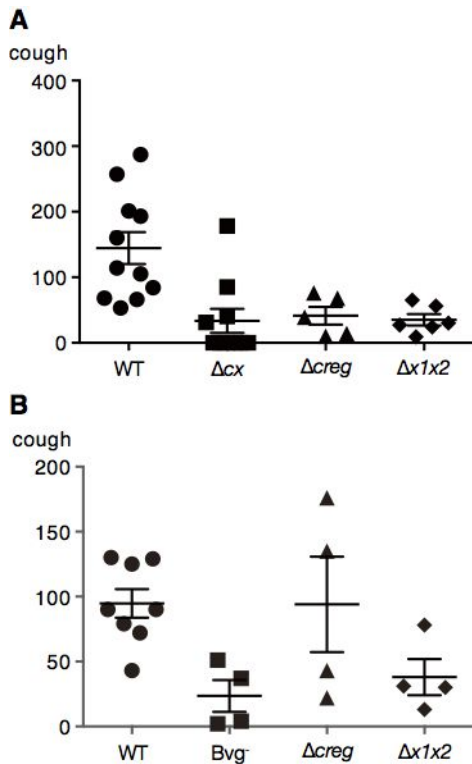


図5. 咳嗽発作候補遺伝子欠失株の感染(A)あるいは  
破砕液投与(B)による咳嗽発作  
各菌株の菌体破砕液において接種動物の咳の回数、  
平均値、および標準誤差が示されている。



図6. 気管支敗血症菌染色体上における  
gene x1およびx2の位置関係

#### < 引用文献 >

1. Elahi S, et al. "The benefits of using diverse animal models for studying pertussis" *Trends Microbiol* 15: 462-46, 2007
2. Sekiya K, et al. "Supermolecular structure of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11638-11643, 2001
3. Cotter PA, et al. "BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of Bordetella bronchiseptica in a rabbit model" *Infect. Immun.* 62: 3381-3390, 1994
4. Nishikawa S, et al. "The bvg-repressed gene brtA, encoding biofilm-associated surface adhesin, is expressed during host infection by Bordetella bronchiseptica" *Microbiol. Immunol.* 60: 93-105, 2016

#### 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)

K. Suzuki, N. Shinzawa, K. Ishigaki, K. Nakamura, H. Abe, A. Fukui-Miyazaki, K. Ikuta, Y. Horiguchi "Protective effects of in vivo-expressed autotransporters against Bordetella pertussis infection" *Microbiol. Immun.* 61: 371-9, 2017 doi: 10.1111/1348-0421.12504

#### 〔学会発表〕(計3件)

篠田典子、中村佳司、神谷重樹、新澤直明、堀口安彦 「気管支敗血症菌を用いたボルデテラ属細菌の発咳機構の解析」人獣共通感染症研究拠点シンポジウム 2018年

照屋志帆乃、福井理、中村佳司、新澤直明、堀口安彦 「Screening for the Bordetella dermonecrotic toxin receptor」第91回日本細菌学会総会 2018年

照屋志帆乃、福井理、中村佳司、新澤直明、堀口安彦 「ボルデテラ壊死毒(DNT)の細胞受容体同定」第70回日本細菌学会関西支部総会 2017年

#### 〔図書〕(計0件)

#### 〔産業財産権〕

特になし

#### 〔その他〕

特になし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

中村 佳司 (NAKAMURA, Keiji)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：60706216