

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23845

研究課題名（和文）百日咳菌が自然環境下で生存する可能性を探る：アメーバとの共存機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the interaction between Amoebae and *B. pertussis* to know if this bacterium can survive in the environment

研究代表者

西田 隆司 (Nishida, Takashi)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20845200

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：百日咳菌は貧栄養状態となる自然環境下では生育できないとされている。本研究では百日咳菌が環境中の原生生物と共存することを想定し、原生生物依存的な百日咳菌の増殖機構を解析した。その結果、百日咳菌はアメーバに貪食される一方で、アメーバ由来の代謝産物が、百日咳菌の貧栄養下における増殖を補助していることを見出した。さらに、アメーバ以外の原生生物も百日咳菌の増殖を補助することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、百日咳菌が原生生物依存的に生存し増殖することが明らかとなった。これは百日咳菌が自然環境中において哺乳類宿主以外の微生物と共存している可能性を提示する成果であり、百日咳菌が自然環境下では生存できないとするこれまでの考えに一石を投じるものである。あらたな百日咳菌の生存様式を解明することは、増加する百日咳を制御する方法を模索する上で重要な知見となり得る。

研究成果の概要（英文）：*Bordetella pertussis* have been considered to be unable to survive in the environments because of poor nutrients. In this study, we hypothesized that *B. pertussis* survive in the environment by living together with protozoa and analyzed the protozoa-dependent growth mechanism of *B. pertussis*. Our results suggested that *B. pertussis* was digested by *Acanthamoeba castellanii* but some metabolites from this protozoa could support the growth of *B. pertussis* in the nutritionally deficient medium. Further, the other protozoa also supported the growth of *B. pertussis*.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳 原生生物

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 再興感染症としての百日咳

ボルデテラ属に分類される代表的な病原細菌である百日咳菌(*Bordetella pertussis*)は、ヒトに感染すると特徴的な咳発作を主徴とする百日咳を引き起こす。百日咳を制御するためにはワクチンが有効とされており、その普及により撲滅できると期待されていた。実際、1950年代からのワクチン開発と普及により、百日咳患者数は一度減少している。しかし近年になり、日本を含む多くの国において百日咳患者数の増加傾向が認められ、再興感染症として問題となっている。この背景として、ワクチン効果の減弱や抗原性の異なる変異株の出現などが挙げられるが、新たなワクチンや治療法の開発は進んでいない状況にある。

### (2) 百日咳菌の生存様式

百日咳菌はヒトへの感染に特化した細菌であり動物には感染せず、ヒトからヒトへの感染により伝播される。また一部の代謝系が機能していないため、貧栄養状態となる自然環境下では生育できないと考えられている。実際にこれまで自然環境中から百日咳菌が分離された報告はない。これらの特徴から、ヒトからヒトへの感染を如何に抑えるのかが、百日咳を予防する上で重要な課題となる。このような背景からこれまでの百日咳菌の研究開発はヒトからヒトへの感染を前提として行われている。しかし、前述のとおりワクチンによる制御が不十分となっており、有効な代替法の開発は進んでいない。これらのことから、これまでとは異なる側面から百日咳菌の感染成立機構を解析する必要があると考えられる。

そこで本研究では、百日咳菌が自然環境中で生存し感染源となる可能性を想定した。百日咳菌と近縁である気管支敗血症菌(*B. bronchiseptica*)は、環境中において粘菌類と共存している可能性が示唆されている。このことから申請者は気管支敗血症菌と同様に、百日咳菌が自然環境中で原生生物依存的に生存している可能性に着目した。実際に粘菌類と同じく原生生物であるアメーバ(*Acanthamoeba castellanii*)を用いた実験を行なったところ、百日咳菌は、単独では増殖せず減少してしまう貧栄養下でも、アメーバとの共培養により生存することが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

これまで百日咳菌は自然環境下では生存できないとされ、ほとんどの試験研究は哺乳類宿主環境を想定して行われてきた。これに対し本研究では、百日咳菌が自然環境中の原生生物と共存していることを想定し、環境中に広く存在するアメーバと百日咳菌との相互作用を解析する。これにより、百日咳菌が原生生物と共存するメカニズムを明らかにするとともに、自然環境における本菌の生存戦略の理解を目指す。

## 3. 研究の方法

### (3-1) 百日咳菌および気管支敗血症菌とアメーバの共存様態の解析

アメーバと共培養時の菌の動態を可視化するため、Mariner トランスポゾンを用いて gfp 遺伝子を百日咳菌と気管支敗血症菌のゲノムに導入した。その後、各菌とアメーバを7日間、20 にて共培養し(MOI=1)、菌の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### (3-2) アメーバとの共培養または培養上清中における百日咳菌の増殖

アメーバを HEPES-Glucose medium (50 mM HEPES, 5mM Glucose, pH7.4)を用いて、20 で5日間培養したのちに培養上清を回収した。次に、百日咳菌を、培地のみまたは培養上清を用いて、14日間、20 で培養した。またアメーバとの共培養(MOI=1)を同様に、14日間、20で行なった。培養開始から2、5、7および14日目に培地中に含まれる菌数の測定を行なった。また37 においても培地のみまたは培養上清を用いた菌の培養を行い、培養開始から1、3および5日目に菌数の測定を行った。さらに Bvg+相または Bvg-相に固定された百日咳菌を用いて同様に培地のみまたは培養上清を用いた培養を20で行い、培養開始から2および7日目に菌数の測定を行なった。

### (3-3) 環境原生生物の培養上清中における百日咳菌の増殖

自然環境中に生息する原生生物である粘菌類(*Dictyostelium discoideum*)と繊毛虫類(*Tetrahymena*)をアメーバと同様に20 で5日間培養したのち、培養上清を回収した。その後、百日咳菌を培地のみまたは培養上清を用いて、7日間、20 で培養した。培養開始から2および7日目に菌数を測定した。

### (3-4) アメーバ培養上清の性状解析

アメーバを20 で5日間培養したのち、培養上清を回収した。培養上清を56 で30分間または98 で5分間熱処理し、百日咳菌の培養に供試した。また限外濾過(MWCO:2000)を用いて培養上清を分画し、その後同様に百日咳菌の培養に供試した。

#### 4. 研究成果

##### (4-1) 百日咳菌および気管支敗血症菌とアメーバの共存様態の解析

GFP を発現させた百日咳菌および気管支敗血症菌をアメーバと共培養し、菌の局在を観察したところ、気管支敗血症菌についてはアメーバ細胞内に集積することが確認された。一方で、百日咳菌においては、アメーバ細胞内での集積は観察されなかったが、細胞外に多数の菌体が観察された。このことから気管支敗血症菌はアメーバによる捕食・消化に対して抵抗し、アメーバ内に集積あるいは増殖するが、百日咳菌はアメーバ細胞内で増殖することはなく、アメーバ細胞外を増殖の場としていることが示唆された。

##### (4-2) アメーバとの共培養または培養上清中における百日咳菌の増殖

百日咳菌をアメーバと共培養またはアメーバの培養上清中において培養したところ、培養上清中では顕著に菌が増殖した(図1)。また培地のみで培養した場合には菌数が減少するのに対し、共培養時には菌の減少は観察されなかった。この結果から、百日咳菌が増殖するためにはアメーバと直接作用する必要はなく、アメーバの培養上清に含まれる何らかの因子が百日咳菌の生存・増殖を補助していることが考えられた。

またアメーバの培養上清中における菌数を37にて確認したところ、20における培養時とは異なり、菌が徐々に減少した。この結果から、百日咳菌は低温環境のみアメーバ依存的に生存・増殖する可能性が考えられたため、温度依存的に百日咳菌の転写調節を行うことが知られているBvgAS二成分制御系に着目した。変異を導入することにより作製されたBvg+相またはBvg-相に固定された百日咳菌の培養上清中における増殖の確認を行なった。しかし、Bvg+相およびBvg-相に固定された百日咳菌の増殖に大きな差異はみられず、20における菌の増殖はBvgAS二成分制御系には依存しないことが示唆された。

##### (4-3) 環境原生生物の培養上清中における百日咳菌の増殖

次に百日咳菌の生存・増殖がアメーバ以外の原生生物によっても補助されるかどうかを検討するため、環境中に広く存在し、生物学分野においてモデル生物としても使われる*D. discoideum*(粘菌類)および*T. sp.*, *T. thermophila*(繊毛虫類)の培養上清を用いて百日咳菌の増殖を確認した(図2)。その結果、両原生生物の培養上清中においても百日咳菌が増殖することが確認された。このことから環境中の原生生物が共通して百日咳菌の生存に寄与する可能性が示された。

##### (4-4) アメーバ培養上清の性状解析

原生生物の培養上清に含まれる何らかの因子が、百日咳菌の増殖を補助していると想定されたため、その性状解析を試みた。培養上清を熱処理し百日咳菌の培養を行なったところ、未処理の培養上清を用いた際と同様に菌が増殖した(図3)。また、限外濾過によって培養上清を分画し、菌の培養に供試したところ、低分子が含まれる分画においてのみ菌の増殖が確認された。これらの結果から、培養上清に含ま

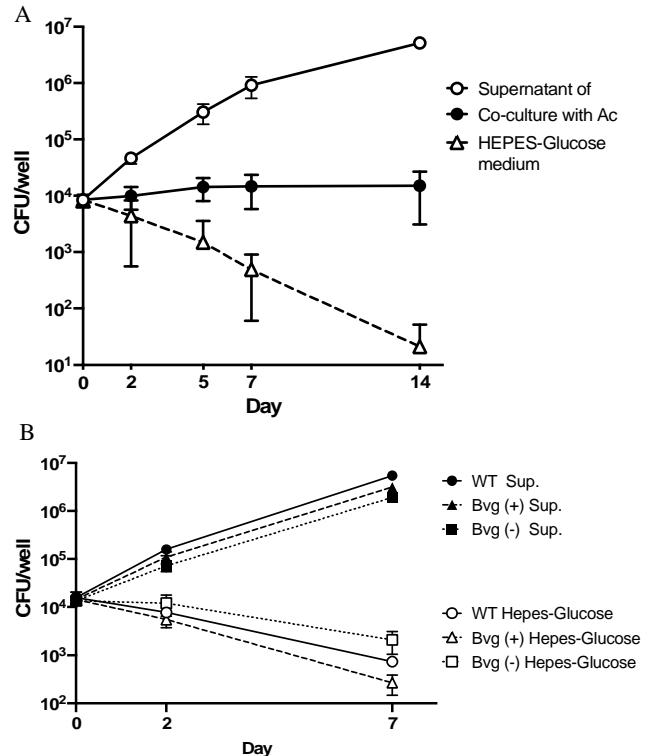


図1. (A) アメーバとの共培養時または培養上清中における百日咳菌の増殖  
(B) Bvg+相またはBvg-相に固定された百日咳菌の増殖

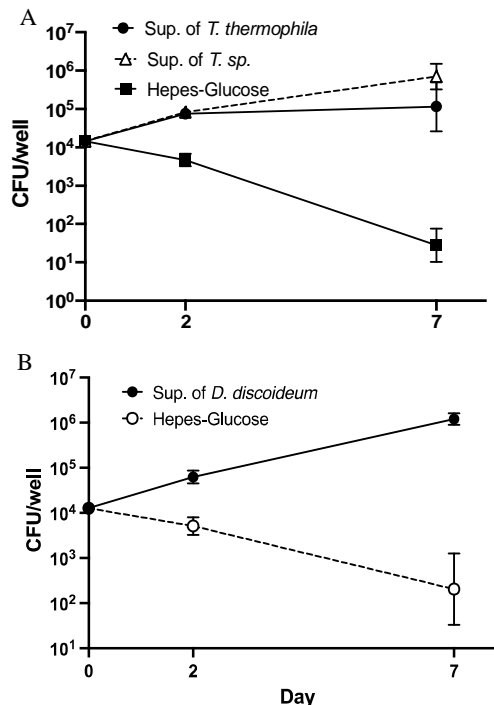


図2. (A) *Tetrahymena* または (B) *Dictyostelium* の培養上清中における百日咳菌の増殖

れる因子は熱に安定でかつ低分子であることが分かり、原生生物由来の代謝産物が百日咳菌の増殖因子であることが予想された。

また百日咳菌の液体培養に用いられるSS培地とアメーバ培養上清とにおける百日咳の増殖を20で比較したところ、培養上清においてより顕著な増殖が確認された。SS培地には百日咳菌の培養に必要な栄養素等が十分含まれていることから、アメーバ由来の代謝産物は百日咳菌に必要な栄養素だけでなく、何らかの増殖因子も含んでいると考えられる。

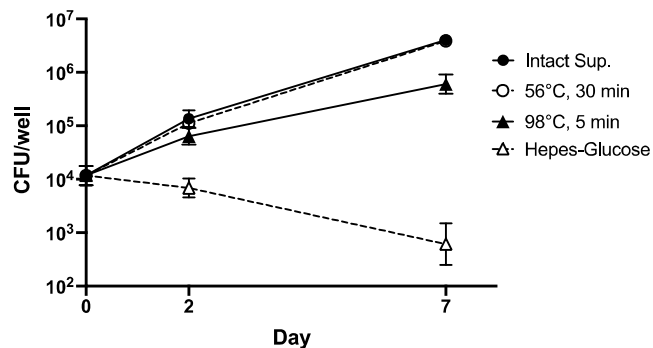


図3. 熱処理した培養上清における百日咳菌の増殖

以上の研究成果から環境原生生物と共存することにより百日咳菌が低栄養環境下でも生存・増殖する可能性が示された。哺乳類宿主以外に焦点をあてた研究報告はこれまでになく、今まで見逃されてきた百日咳菌の新たな生存様式を提示する成果であると考えている。一方で、本研究期間内では原生生物由来因子の同定とその作用機序の解明には至らなかった。今後は、質量分析等を用いて原生生物由来因子の同定を行い、さらに百日咳菌および原生生物の変異株を利用し解析することで、貧栄養、低温下における百日咳菌の増殖機序を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Teruya Shihono, Hiramatsu Yukihiko, Nakamura Keiji, Fukui-Miyazaki Aya, Tsukamoto Kentaro, Shinoda Noriko, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Ishigaki Keisuke, Shinzawa Naoaki, Nishida Takashi, Sugihara Fuminori, Maeda Yusuke, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Bordetella Dermonecrotic Toxin Is a Neurotropic Virulence Factor That Uses CaV3.1 as the Cell Surface Receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e03146-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.03146-19	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 Nishida Takashi, Nakagawa Natsuko, Watanabe Kenta, Shimizu Takashi, Watarai Masahisa	4. 巻 2019
2. 論文標題 Attenuated Legionella pneumophila Survives for a Long Period in an Environmental Water Site	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/8601346	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平松征洋、鈴木孝一朗、西田隆司、堀口安彦
2. 発表標題 マウス咳発症モデルを用いた百日咳の咳発作発症機構の解明
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松征洋、鈴木孝一朗、西田隆司、堀口安彦
2. 発表標題 マウスモデルから見た百日咳における咳発作発症機構
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 玉木優生、西田隆司、平松征洋、堀口安彦
2. 発表標題 新規発光システムを用いた気管支敗血症菌感染のin vivoイメージング手法の構築
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020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