

機関番号：14401  
研究種目：基盤研究(B)  
研究期間：2008年～2010年  
課題番号：20390126  
研究課題名(和文) 百日咳菌の宿主特異性に関わる遺伝子の検索  
研究課題名(英文) Study on factors that determine the host specificity of *Bordetella pertussis* infection.  
研究代表者  
堀口 安彦 (HORIGUCHI YASUHIKO)  
大阪大学・微生物病研究所・教授  
研究者番号：00183939

研究成果の概要(和文)：百日咳菌の宿主特異性に関わる遺伝子を探索するために、感染動物内で特異的に発現する遺伝子群を網羅的に解析するシステムを考案した。このシステムは in vivo expression technology (IVET) と免疫沈降法から構成されており、研究代表者らはこれを IVET-IP (in vivo expressed-tag immunoprecipitation) と名付けた。

研究成果の概要(英文)： We developed a novel method termed IVET-IP (in vivo expressed-tag immunoprecipitation system), which enables us to identify bacterial genes expressed in host environments. This method could be useful to search factors that determine the host specificity of *Bordetella pertussis*.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：百日咳菌、気管支敗血症菌、In vivo expression technology

## 1. 研究開始当初の背景

百日咳は百日咳菌の上部気道感染によって起こる伝染性の疾患である。WHOによると、百日咳による死亡者数は年間に世界で20・30万人で、この数字は原因菌の明らかな細菌感染症では破傷風と並んで、結核について2あるいは3番目に高い。百日咳の原因となる百日咳菌はヒトにしか感染しない。このため、感染実験モデルが成立しない。このことは本菌の感染過程の解析の大きな障壁となっており、実際に本菌の感染病態はほとんど

解明されていない。一方、百日咳菌と同じボルデテラ属に分類される気管支敗血症菌は哺乳類できわめて広い宿主域を示すことが知られている。本菌はまれにヒトにも感染するが、百日咳の主要病原因子である百日咳毒素を産生しないこともあり、顕著な症状を示すことはない。2003年に、百日咳菌と気管支敗血症菌およびパラ百日咳菌の三種のボルデテラ属病原細菌の全ゲノムが解読された。その結果によると、これら三菌種の祖は気管支敗血症菌に近く、それから遺伝子欠失と組み替えが繰り返されて、パラ百日咳菌と

百日咳菌が派生したことが推測される。また、三菌種間の各遺伝子の相同性は高く、遺伝学的にきわめて近縁であり、それぞれは独立した菌種というよりもむしろ気管支敗血症菌を祖とする亜菌種と考えるべきとの指摘もある。

以上のことから、研究代表者らは、遺伝学的にきわめて近縁なゲノムを共有しながら感染宿主域が大きく異なる気管支敗血症菌と百日咳菌は、感染宿主特異性を規定する細菌側因子を検索するのに格好の材料になりうると考え、本研究課題を計画した。この研究成果から、「病原細菌に宿主特異性が認められるのはなぜか？」という細菌学上の基本的な疑問に回答を与えるヒントが得られるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の特異的なヒト感染性を規定する細菌側因子を遺伝子レベルで探索することにある。このため、百日咳菌類縁で哺乳類を広く宿主域に持つ気管支敗血症菌 (*B. bronchiseptica*) を材料に用い、実験動物の感染モデルで特異的に発現する気管支敗血症菌遺伝子を探索するための方法論を確立することを当初の目的とした。とくに研究代表者らがこの目的のために以前に開発した RIVET の欠点を克服する新しい技術として考案した *in vivo* expressed tag-immunoprecipitation (IVET-IP)法の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) IVET-IP 法の条件検討

#### ① レポーターとなる菌体表層タンパク質の選別

本課題では実験動物への感染能があきらかな気管支敗血症菌を使用した。本菌は百日咳菌の近縁種である。気管支敗血症菌の菌体表層タンパク質 (パータクチン、FHA、BrkA、BipA、BcfA など) と各種標識タグの融合遺伝子を作製して菌体で発現させ、表層露出の程度や各タグに対する抗体による結合度などを検討し、最適のレポーターとなる表層タンパク質-タグの組み合わせを決定した。この際、表層タンパク質の部分的な断片のみをレポーターとして使用して、その発現が菌の機能に付加的な影響を与えないように考慮した。

#### ② 免疫沈降法の検討

使用するレポーターのタグの種類を検討するとともに、タグに対する抗体の種類を検討した。抗体を用いて菌を分離するための担体 (磁性ビーズやアフィニティービーズ)

についても数種類のものを検討した。

#### ③ マイクロアレイ

気管支敗血症菌の遺伝子を漏らさず解析するため、一定の長さ以上の遺伝子間領域およびその周辺領域を対象にして、Tm 値が近似してかつクロスハイブリダイゼーションの起こらないオリゴヌクレオチドからなるプローブのマイクロアレイをデザインした。

### (2) IVET-IP 法の有効性検証

供試菌の気管支敗血症菌には BvgA/BvgS と呼ばれる二成分制御系が存在することが知られており、その制御下にある遺伝子がいくつか明らかにされている。BvgA/BvgS は *in vitro* の 37°C の環境で通常活性化されているが、ナイアシン酸や硫酸マグネシウムの存在下で不活性化する。そこで、BvgA/BvgS で制御される代表的な遺伝子のプロモーター領域を使用して、条件検討した IVET-IP 法に用いるレポーター遺伝子を組み込んだベクターを気管支敗血症菌に導入し、硫酸マグネシウムの存在下/非存在下で培養して免疫沈降まで行う。その結果、実際に BvgA/BvgS の活性状態に依存して目的のプロモーター領域を含む菌が優勢に回収できるかどうか検証した。

### (3) 感染動物実験モデルにおける IVET-IP 法の使用

ラットに  $10^3$ - $10^5$  の IVET-IP 用のライブラリを導入した供試菌を鼻腔感染させ、任意の感染期間で呼吸器官を材料に IVET-IP を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) IVET-IP 法

菌体表層に提示される標識蛋白質の遺伝子上流にゲノムライブラリを挿入し、感染過程で発現するライブラリを導入された菌株のみを選択的に回収し、網羅的に解析する改良型 IVET 法を考案した。細胞感染モデル実験と組み合わせる菌体の回収およびライブラリの抽出などの諸条件の検討を行い、感染過程において経時的に発現する遺伝子群探索に使用でき、免疫沈降の再現性の高い菌体表層タンパク質とタグの組み合わせを決定した。

### (2) 遺伝子間領域のみをプローブとするカスタムマイクロアレイ

IVET システムで選択回収されたライブラリを網羅的に解析する目的で気管支敗血症菌のゲノム配列情報から遺伝子間領域が 100bp 長を超える 1469 領域をプローブとするカスタムアレイを設計した。本アレイの使用条件の検討を行い、網羅的解析に使用できる実験条件を確立した。

### (3) IVET-IP法の有効性検証

本年度は、培地へのMgSO<sub>4</sub>添加により気管支敗血症菌の遺伝子発現が変動することを利用して本法の有効性の検討を行った。その結果、MgSO<sub>4</sub>添加培地で培養したライブラリ導入菌株群からはMg<sup>2+</sup>イオンによって正に制御される鞭毛遺伝子群が、MgSO<sub>4</sub>無添加培地で培養したライブラリ導入菌株群からはMg<sup>2+</sup>イオンによって負に制御される病原性遺伝子群が、それぞれ選択的に回収されることを確認できた。さらに、既知のプロモーターを導入した菌株とラット感染モデル実験系を用いて本法を行うと、宿主の気管から病原性遺伝子のプロモーターを導入した菌株が選択的に回収されることも確認できた。

### (4) 感染動物実験モデルにおけるIVET-IP法の使用

気管支敗血症菌を三種の動物（マウス、モルモット、ラット）に感染させる感染動物モデル実験系を構築した。感染成立後、肺と気道組織から菌を回収する実験手法および条件も確立した。とくにラット感染モデルにおいて、感染1, 3, 9, 15, 30日後の気道組織から試料を調製し、感染期間を通じて発現が強く誘導される遺伝子群をリスト化した。これらの遺伝子の機能解析を通して宿主域の広い気管支敗血症菌と宿主をヒトに局限した百日咳菌の感染性の違いを明らかにする分子生物学的基礎知見を提供できると考えている。

### 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 17 件)

1. Fukui-Miyazaki, A., S. Ohnishi, S. Kamitani, H. Abe, and Y. Horiguchi. 2011. Bordetella dermonecrotic toxin binds to target cells via the N-terminal 30 amino acids. Microbiol. Immunol. 55:154-159. (査読有)
2. Kimura, J., H. Abe, S. Kamitani, H. Toshima, A. Fukui, Miyake, M. Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi, S. Yamamoto, Y. Horiguchi. 2010. Clostridium perfringens enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. The Journal of biological chemistry 285:401-408. (査読有)
3. Kamitani, S., K. Kitadokoro, M. Miyazawa, H. Toshima, A. Fukui, H. Abe, M. Miyake, and Y. Horiguchi. 2010.

Characterization of the membrane-targeting C1 domain in Pasteurella multocida toxin. The Journal of biological chemistry 285:25467-25475. (査読有)

4. Fukui-Miyazaki, A., S. Kamitani, M. Miyake, and Y. Horiguchi. 2010. Association of Bordetella dermonecrotic toxin with the extracellular matrix. BMC microbiology 10:247. (査読有)
5. Saeki, R., M. Kondoh, H. Kakutani, S. Tsunoda, Y. Mochizuki, T. Hamakubo, Y. Tsutsumi, Y. Horiguchi, and K. Yagi. 2009. A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. Mol Pharmacol 76:918-926. (査読有)
6. Isegawa, Y., J. Hara, K. Amo, Y. Osugi, M. Takemoto, K. Yamanishi, R. Fukunaga, M. Shibata, , and A. Ohshima, Y. Horiguchi, N. Sugimoto, 2009. Human herpesvirus 6 ganciclovir-resistant strain with amino acid substitutions associated with the death of an allogeneic stem cell transplant recipient. J Clin Virol 44:15-19. (査読有)
7. Takahashi, A., E. Komiya, H. Kakutani, T. Yoshida, M. Fujii, Y. Horiguchi, H. Mizuguchi, Y. Tsutsumi, S. Tsunoda, N. Koizumi, K. Isoda, K. Yagi, Y. Watanabe, and M. Kondoh. 2008. Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis. Biochem Pharmacol 75:1639-1648. (査読有)
8. Ohnishi, H., M. Miyake, S. Kamitani, and Y. Horiguchi. 2008. The morphological changes in cultured cells caused by Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. FEMS Microbiol Lett 279:174-179. (査読有)
9. Miyake, M., S. Sakane, C. Kobayashi, M. Hanajima-Ozawa, A. Fukui, S. Kamitani, and Y. Horiguchi. 2008. A colorimetric assay for studying effector secretion through the bacterial type III secretion system. FEMS Microbiol Lett 278:36-42. (査読有)
10. Isegawa, Y., Y. Miyamoto, Y. Yasuda, K. Semi, K. Tsujimura, R. Fukunaga, A. Ohshima, Y. Horiguchi, Y. Yoneda, and N. Sugimoto. 2008. Characterization of the human herpesvirus 6 U69 gene product

and identification of its nuclear localization signal. *J Virol* 82:710-718. (査読有)

11. Kitadokoro, K., S. Kamitani, M. Miyazawa, M. Hanajima-Ozawa, A. Fukui, M. Miyake, and Y. Horiguchi. 2007. Crystal structures reveal a thiol protease-like catalytic triad in the C-terminal region of *Pasteurella multocida* toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5139-5144. (査読有)

12. Harada, M., M. Kondoh, C. Ebihara, A. Takahashi, E. Komiya, M. Fujii, H. Mizuguchi, S. Tsunoda, Y. Horiguchi, K. Yagi, and Y. Watanabe. 2007. Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (*Biochem Pharmacol* 73:206-214. (査読有)

13. Hanajima-Ozawa, M., T. Matsuzawa, A. Fukui, S. Kamitani, H. Ohnishi, A. Abe, Y. Horiguchi, and M. Miyake. 2007. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, and *Listeria monocytogenes* recruit a junctional protein, zonula occludens-1, to actin tails and pedestals. *Infect Immun* 75:565-573. (査読有)

14. Ebihara, C., M. Kondoh, M. Harada, M. Fujii, H. Mizuguchi, S. Tsunoda, Y. Horiguchi, K. Yagi, and Y. Watanabe. 2007. Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin for modulation of tight junction. *Biochem Pharmacol* 73:824-830. (査読有)

15. Miyazawa, M., K. Kitadokoro, S. Kamitani, H. Shime, and Y. Horiguchi. 2006. Crystallization and preliminary crystallographic studies of the *Pasteurella multocida* toxin catalytic domain. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62:906-908. (査読有)

16. Fukui, A., and Y. Horiguchi. 2006. Dermonecrotic toxin: The old but new virulence factor produced by *Bordetella* spp. *Toxin Rev.* 25:125-135. (査読有)

17. Ebihara, C., M. Kondoh, N. Hasuike, M. Harada, H. Mizuguchi, Y. Horiguchi, M. Fujii, and Y. Watanabe. 2006. Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Pharmacol Exp Ther* 316:255-260. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. 木村淳, 安倍裕順, 神谷重樹, 戸嶋ひろ野, 福井理, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2009. 3. 12. ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体認識機構の解析. 日本細菌学会. 名古屋市 名古屋国際会議場.

2. 神谷重樹, 北所健悟, 戸嶋ひろ野, 福井理, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2008. 3. 24. パスツレラ毒素C1ドメインの膜局在化能の機能解析. 日本細菌学会. 京都市 国立京都国際会館

3. 木村淳, 安倍裕順, 神谷重樹, 戸嶋ひろ野, 福井理, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2008. 12. 9. ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体認識機構の解析. 分子生物学会. 横浜市 パシフィコ横浜.

4. 福井理, 神谷重樹, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2007. 12. 11. *Bordetella*皮膚壊死毒素の細胞外マトリクスへの付着. 日本分子生物学会日本生化学会合同大会. 横浜市 パシフィコ横浜

6. 木村淳, 神谷重樹, 戸嶋ひろ野, 福井理, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2007. 12. 11. ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体認識機構の解析. 日本分子生物学会 日本生化学会合同大会. 横浜市 パシフィコ横浜.

5. 神谷重樹, 北所健悟, 宮澤雅之, 福井理, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2007. 3. 26. *Pasteurella multocida* toxinに存在するシステインプロテアーゼ様活性中心. 日本細菌学会. 大阪市 アジア太平洋トレードセンター.

7. 北所健悟, 神谷重樹, 宮澤雅之, 福井理, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2007. 3. 26. *Pasteurella multocida* toxin (PMT)の活性ドメインの全体構造. 日本細菌学会. 大阪市 アジア太平洋トレードセンター.

8. 木村淳, 福井理, 神谷重樹, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2006. 3. 29. *Bordetella*属細菌の菌体遊離型壊死毒の検出. 日本細菌学会. 金沢市観光会館.

9. 坂根貞嗣, 花嶋美幸, 堀口安彦, and 三宅眞実. 2006. 3. 29. 腸管病原性大腸菌3型分泌装置により分泌されるエフェクターの宿主細胞内移行検出系の開発. 日本細菌学会. 金沢市観光会館.

[その他]

ホームページ等

<http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口 安彦(HORIGUCHI YASUHIKO)  
大阪大学・微生物病研究所・教授  
研究者番号：00183939

(2) 研究分担者

神谷 重樹 (KAMITANI SHIGEKI)  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号：60379089

福井 理 (FUKUI AYA)  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号：70397743