

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16243

研究課題名(和文)新規発光システムAkaBLIを用いた百日咳菌の感染成立必須遺伝子群の同定と解析

研究課題名(英文) Analysis and identification of virulence genes for *B. pertussis* infection by in vivo imaging system

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトに感染し特徴的な咳発作を引き起こす百日咳菌は、これまでに多様な病原因子が同定されている一方で、感染成立機序の全容は不明のままである。そこで本研究では、複数の病原因子を同時に解析することで、百日咳菌の感染成立機序の解明を試みた。まず、近縁菌である気管支敗血症菌とその自然宿主であるラットを感染モデルとし、生体内における菌の消長を継続的に評価するためにin vivoイメージングシステムの構築を行なった。次に、百日咳菌と共通する既知の病原因子の多重欠損株を作製し、その感染性を評価した。その結果、毒素や付着因子などの病原因子を欠損させても気管支敗血症菌が生体内で一時的に増殖することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では菌の生体内動態を継続的に評価することで、感染初期から後期において、気管支敗血症菌の病原因子が異なるタイミングで機能していることを明らかとした。また感染初期においては未知の因子が感染に関与する可能性を示した。この成果は百日咳菌の感染成立機序を包括的に理解するための端緒となり、将来的には感染成立機序の解明を通して、百日咳を制御する方法の構築につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The infectious mechanism of *Bordetella pertussis*, which is causative agent of Pertussis (whooping cough), is still unclear even though various virulence factors are identified. In this study, to reveal its infectious mechanism, we analyzed its virulence factors at once. First, *Bordetella bronchiseptica* and rats were used as an infectious model and the imaging system was constructed to visualize bacteria in vivo. Next, by in vivo imaging system, the infection ability of mutant strains lacking several virulence genes were evaluated. Our results suggested that *B. bronchiseptica* had ability to infect its host temporarily without known virulence factors.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳 生体イメージング 気管支敗血症菌

## 1. 研究開始当初の背景

### (百日咳の現状)

百日咳は、ボルデテラ属の代表的な病原細菌である百日咳菌(*Bordetella pertussis*)の感染によって起こる、特徴的な咳発作を伴う呼吸器感染症である。1950年代から始まるワクチン開発と普及によりその患者数は一度減少している。しかし、ワクチンが普及しているにも関わらず、近年では、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になっている。そのため百日咳を制御するために、百日咳菌の感染成立機序や病態形成機序の解明が求められる。

これまでの *in vitro* を中心とした研究成果から、百日咳菌の病原因子として多様な付着因子や毒素等が同定され、それぞれの生物学的な機能が明らかとなっている。しかし、百日咳菌の感染成立過程や病態形成過程において、個々の病原因子が果たす役割については未だに議論の余地がある。実験動物を用いた百日咳の *in vivo* の解析においては、病原因子の単一欠損株を感染させても、その感染性は完全には消失しない。また、近年になり、病原因子の一つであるパータクチンを産生しない株が患者から分離されるようになってきている。これらのことから、百日咳菌が感染を成立させ病原性を示す過程においては、個々の病原因子の寄与は大きくなく、複数の病原因子が相補的あるいは重複して機能している可能性が示唆される。よって、百日咳菌の感染成立機序および病態形成機序を解明するためには、個々の因子の解析だけでは不十分であり、複数の病原因子を総合的に解析する必要がある。

### (百日咳菌の実験動物モデル)

百日咳菌はヒトへの感染に特化した細菌である。そのため、汎用されるマウスを利用した百日咳菌の感染モデルでは多数の菌の投与が必要であり、自然感染病態を再現できているとは言い難い。このことは *in vivo* における病態形成機序の研究が進まない一因となっている。そこで本研究では、百日咳菌の類縁菌であり、多くの共通する病原因子を持つ気管支敗血症菌(*B. bronchiseptica*)とラットを用いた感染モデルを使用することとした。この「気管支敗血症菌-ラットモデル」においては、10 CFU 程度の気管支敗血症菌の投与で感染が成立し、百日咳の主要病態である咳発作を再現することが出来る。一方、病原因子とされる遺伝子を単一で欠損させた菌を感染させても、定着菌数や咳発作誘導能には影響がない。

実験動物を用いた細菌学的研究では細菌数の測定が汎用されるが、1つのデータを得るために1個体を犠牲にする必要がある。よって、複数の遺伝子に注目するなど条件が多岐にわたる場合、大量の動物を処置せざるを得ず、時間的予算的さらには動物実験倫理の観点からも実施が困難であった。そこで、これらの問題を解決するためには、生物発光システムを用いた *in vivo* イメージングによる解析手法を構築することとした。

## 2. 研究の目的

百日咳菌の感染成立には複数の遺伝子が相補的に機能しているとの仮説を立て、これらの遺伝子を感染成立に必須な「病原遺伝子群」として同定する。本研究の目的は個々の病原因子の機能解明でなく、百日咳菌の感染成立過程における「病原遺伝子群」の機能を解析することで、感染成立機序の全容を包括的に理解することにある。

## 3. 研究の方法

### (3-1) *in vivo* イメージングシステムの構築

tac プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子 (*Fluc*、*Akaluc* またはコドンを用いた気管支敗血症菌に最適化した *Akaluc* (*Akaluc<sup>OPT</sup>*)) を連結したプラスミドを作製した。次に、tac プロモーターとルシフェラーゼの遺伝子を相同組換えの手法により気管支敗血症菌(RB50株)のゲノムに組み込むことで、抗生物質による選択圧がない環境でもルシフェラーゼを恒常的に発現する株を作製した。作製した株が基質存在下で発光することを *in vitro* において確認するため、対数増殖期における菌を  $1 \times 10^8$  CFU/well となるように、96-well プレートに播種し、基質 (D-luciferin または Akalumine) 存在下における発光強度を IVIS Imaging System にて定量した。

次にルシフェラーゼ発現株をラットに経鼻投与し ( $1 \times 10^3$  CFU/rat)、感染後7から12日後に種々の濃度の基質を腹腔投与(D-luciferin: 500 nmol/g BW, Akalumine: 250 nmol/g BW)または経鼻投与(25  $\mu$ L/rat)し、発光を IVIS Imaging System にて観察し定量した。

### (3-2) 多重遺伝子欠損株の感染能評価

既知の病原因子を包括的に解析するため、まず相同組み換えを利用した方法を用いて気管支敗血症菌の多重遺伝子欠損株の作製を行った。病原因子としては、毒素、3型分泌装置、付着因子を選定した。さらに欠損株に(3-1)と同様の方法で *Fluc* 遺伝子を導入することで、発光する欠

損株を作製した。

次にラットの気道に定着した菌数を従来法および構築した *in vivo* イメージングシステムにより評価した。従来法においては、野生株 (S798 株) および多重遺伝子欠損株を感染させ、10 日後にラットの気管を回収・破碎し、適宜希釈した後に BG 血液寒天培地で培養し、CFU を算定した。イメージングシステムによる評価では、RB50 株を親株とし、毒素および 3 型分泌装置を欠損させた株 ( $\Delta 4$ )、付着因子欠損株 ( $\Delta fhaB$ ,  $\Delta fim$ ) および多くの病原因子を発現しないことが知られている Bvg-相固定株 (Bvg-locked) を感染させ、菌の消長を約 2 ヶ月間観察し、頸部および鼻部における発光強度を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (4-1) *in vivo* イメージングシステムの構築

生体内における菌を可視化するために、酵素 Fluc とその基質 D-luciferin からなる発光システム (Fluc/D-luciferin) または同システムを人工的に改良した Akaluc および Akalumine からなる発光システム (Akaluc/AkaLumine) を用いて、基質存在下で発光する気管支敗血症菌の作製をした。それぞれの酵素を発現する菌と基質を 96-ウェルプレートに添加し、発光を定量した結果、いずれの基質濃度においても、Akaluc 発現株に AkaLumine を添加した場合 (RB50::Akaluc/ AkaLumine) の方が Fluc 発現株に D-luciferin を添加した場合 (RB50::Fluc/ D-luciferin) よりも強い発光が確認された (図 1)。さらにコドン最適化した Akaluc を発現させた株 (RB50::Akaluc<sup>OPT</sup>) において最も強い発光が確認された。また AkaLumine を基質とした場合の発光強度は濃度依存的な増加はほとんどみられなかったが、RB50::Fluc はの発光は、Fluc の濃度依存的に増加し、10 mM においては RB50::Akaluc<sup>OPT</sup>/ AkaLumine と同程度の発光強度が確認された (データ未掲載)。

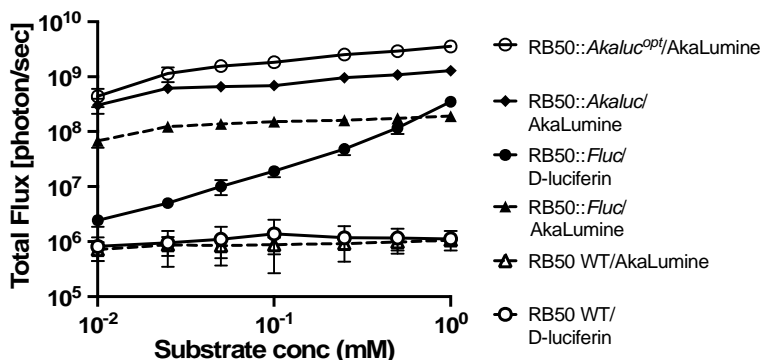


図 1. *in vitro* におけるルシフェラーゼ発現株の発光強度

次に作製した Fluc 発現株および Akaluc<sup>OPT</sup> 発現株をラットに感染させ、生体内に定着した菌からの発光シグナルの検出を試みた。まず各菌株を感染させた後、それぞれの基質を腹腔投与した。その結果、Akaluc<sup>OPT</sup> 発現株の感染においては、気道に定着した菌からの発光シグナルを検出することが出来たが、Fluc 発現株の感染では菌からのシグナルは検出されなかった。しかしながら Akalumine 投与群においては、肝臓から非特異的なシグナルも検出された。そこで、基質の投与経路を経鼻投与に変更し、再び菌の検出を行なったところ、Fluc 発現株および Akaluc<sup>OPT</sup> 発現株からの発光シグナルを検出することに成功した。次に、最大発光強度を得るための基質濃度を確認するため、それぞれの基質を種々の濃度で投与し、ラット頸部における発光シグナルの定量を行なった (図 2)。その結果 Akaluc<sup>OPT</sup> 発現株を感染させた場合、Fluc 発現株よりも 2 倍程度強い発光シグナルが検出されたが、Fluc 発現株においても、十分に検出可能な発光が観察された。また基質濃度に関わらず同程度のシグナルが検出されたため、最大発光強度を得るのに十分な基質量が投与されていることが確認された。このことから Fluc/D-luciferin を用いて、*in vivo* イメージングを行うこととした。

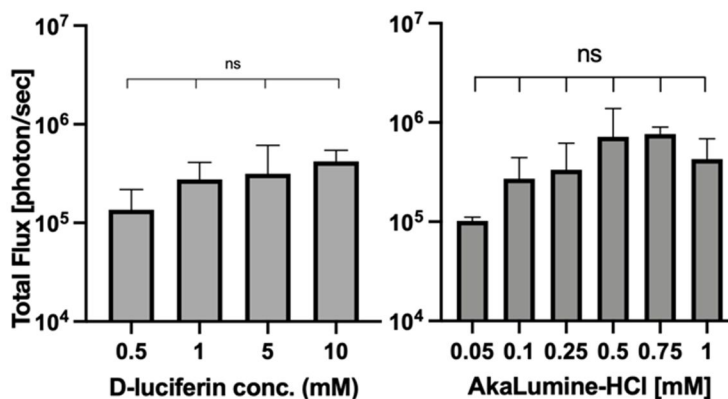


図 2. *in vivo* におけるルシフェラーゼ発現株の発光強度

##### (4-2) 多重遺伝子欠損株の感染能評価

百日咳菌と気管支敗血症菌は多くの共通する病原因子を保持しているが、いくつかの単一の病原因子を欠損した気管支敗血症菌はラットに対して野生株と同等の感感性を示す。そこで、複数の病原因子を欠損した株の作製を行ない、その感染性を従来法および構築した *in vivo* イメージングシステムにより評価した。その結果従来法では、感染 10 日目において、毒素等を欠損させた株の定着菌数は野生株と同程度であったが、付着因子を欠損させた株の菌数は顕著に減少した。これに対し、構築した *in vivo* イメージングシステムでは、付着因子欠損株も感染初期に

おいては一時的に気道で増殖することが確認され、その後速やかに減少した。また、野生株は感染 2 ヶ月後まで気道に定着していたのに対し、毒素等欠損株の気道への定着菌数は感染 2 週間後までは野生株と同程度であったが、その後野生株より速やかに減少した (図 3)。

総括として、本件研究では当初の目的である感染に必須な「病原遺伝子群」を同定するまでには至らなかった。しかし、気管支敗血症菌の体内動態を評価するための *in vivo* イメージングシステムを構築し、同システムを用いることで、既知の付着因子非依存的に気管支敗血症菌が一時的に宿主内で増殖することが明らかとなり、未知の因子が気管支敗血症菌の初期感染に寄与する可能性が示された。また、毒素等の病原因子は感染初期から中期においては、菌の感染に寄与しておらず、感染後期において宿主の免疫応答等による菌の排除に対して抵抗するための何らかの機能を有していることも示唆された。これらの成果は気管支敗血症菌および百日咳菌の病原因子が感染成立過程や病態形成過程において果たす役割を解析していくための端緒となると考えている。今後は初期感染に必要な未知の病原因子の探索を行うとともに、感染後期における毒素等の病原因子が果たす役割を明らかにしていく予定である。

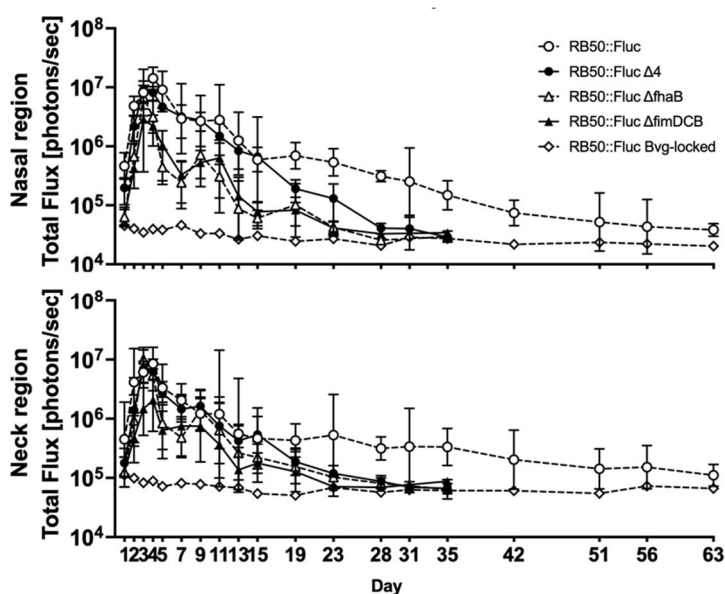


図 3. ラットの鼻部および頸部からの発光強度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiramatsu Yukihiko, Nishida Takashi, Nugraha Dendi Krisna, Sugihara Fuminori, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Melanin Produced by Bordetella parapertussis Confers a Survival Advantage to the Bacterium during Host Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e0081921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00819-21	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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invivoイメージング手法の構築
3. 学会等名 第73回細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020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 The mechanism of pertussis cough revealed by the mouse-coughing model
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
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 マウス咳発症モデルを用いた百日咳の咳発症メカニズムの解析
3. 学会等名 第15回細菌学若手コロッセウム
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 百日咳の咳発作はリポオリゴサッカライド、Vag8、百日咳毒素の協調作用によって起こる
3. 学会等名 第67回トキシシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松 征洋、西田 隆司、Dendi Krisna Nugraha、堀口 安彦
2. 発表標題 Bordetella parapertussis produces melanin involved in the bacterial survival during host infection
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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