

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19378

研究課題名（和文）百日咳菌の病原性発現制御系を利用した新たな感染防御法の探索

研究課題名（英文）Development of a novel agent to control *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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究計画では、百日咳菌の病原性が単一のマスターレギュレーター（BvgAS系）によって制御されていることに着目し、これをオフにして菌を非病原性化する化合物を探索した。この目的のため、百日咳菌のBvgAS系の不活化状態で発現する遺伝子2種と、BvgASが活性化状態（Bvg+相）で発現する遺伝子2種のプロモーター活性を評価するアッセイ系を作製し、FDA承認済の1,134種類の化合物ライブラリーをスクリーニングした。その結果、有力な化合物候補としてロニダミンを見出した。ロニダミンはBvgSのペリプラズムドメイン（VFT2）に結合し、最少有効濃度は50nMで本菌を非病原性化することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症である百日咳の治療には菌の排除のためにマクロライド系の抗生剤が第一選択薬として使用されているが、近年世界各国でマクロライド耐性の本菌の分離が報告されており、米国疾病予防管理センターは本菌の薬剤耐性化を潜在的脅威として注意を喚起している。このため抗生剤に頼らない本菌の感染制御法の開発が模索されているところである。本研究結果はlonidamineが新しい感染制御法に使用する格好の薬剤候補として考えられることを示唆しており、この方面の研究進展に著しく貢献する可能性を秘めていると研究代表者らは考えている。

研究成果の概要（英文）：The pathogenicity of *Bordetella pertussis* (Bp) is regulated by the BvgAS two-component system. This study aimed to seek an agent that converts Bp to be nonpathogenic by inactivating the BvgAS system, which may provide an antibiotic-free therapeutic measure against Bp infection. To this end, we established a reporter system consisting of four distinct Bp reporter strains carrying the GFP gene and upstream promoters for genes explicitly expressed in the BvgAS active or inactive states. The screening of the FDA-approved drug library using the four reporter strains demonstrated that lonidamine an anticancer compound, inactivates the BvgAS system at 50 nM. The isothermal titration calorimetry revealed the direct binding of lonidamine to the periplasmic VFT2 domain of BvgS.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳 二成分制御系 感染制御

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

百日咳は、百日咳菌を原因とする発作性咳嗽をはじめ気管支肺炎、肺高血圧、低血糖症、白血球増多症、まれに脳症等の症状を伴うヒトの呼吸器感染症である。主に発展途上国での乳幼児感染が最も問題視されているが、先進国においても乳幼児期のワクチン接種の効果が減弱した青年期の感染や、ワクチン成分と抗原性の異なる抗原変異株の出現で罹患者数が増加しており、いわゆる再興感染症の一つに挙げられている。患者にはマクロライド系の抗生剤が第一選択薬として本菌の排除に使用されているが、患者の負担になる上述の諸症状を緩和する治療方法は確立していない。さらに、我が国を含む世界各国でマクロライド耐性の本菌の分離が報告されており、米国疾病予防管理センター(CDC)は本菌の薬剤耐性化を潜在的脅威として注意を喚起している(CDC, Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019)。

一方、研究代表者らは長年にわたって百日咳菌に代表される気道感染細菌であるボルデテラの病原性を解析してきた。典型的な病原性ボルデテラ(百日咳菌、パラ百日咳菌、気管支敗血症菌)はきわめて相同性の高い多数の病原因子をほぼ共通の発現制御系のもとで産生する。この発現制御系は BvgAS 二成分制御系と呼ばれ、生育環境の変化を感知するセンサー BvgS と、その下流に存在する転写因子である BvgA の二成分で構成される。BvgAS 系が活性化する環境ではボルデテラは知られている全ての病原因子を産生して病原性を発揮する(この表現型を Bvg⁺相と呼ぶ)。一方、BvgAS が不活性化すると病原性因子の発現が遮断され、菌は非病原性(Bvg⁻相)となる。このボルデテラの BvgAS 系の特徴は、不活性化して Bvg⁻になると一切の病原性因子の発現を止めて非病原性になるということと、病原性ボルデテラの進化の過程で菌種にかかわらず共通に保存されているということにある。Bvg⁻相で固定された百日咳菌変異株は動物に定着できないが、*in vitro* の培養では野生型と同様に生育する。すなわち、菌の病原性が専ら単一の二成分制御系で制御されている点において、ボルデテラ属細菌はきわめて特徴的であると考えることができる。

2. 研究の目的

以上の事実を背景に、研究代表者らは百日咳菌の BvgAS 二成分制御系を人為的にオフにする有用化合物を探索同定し、これを利用することによって菌を非病原性化して感染制御する方法論の確立を目指した。BvgAS 二成分制御系は、生育環境の変化を感知する BvgS センサーキナーゼと、その下流に存在する転写因子である BvgA レスポンスレギュレーター二成分で構成される。一般に、菌は通常の培養条件下では病原性の Bvg⁺相であり、BvgS にリガンドが結合するとキナーゼ活性が消失し、つづいて下流の BvgA が不活性化して菌は非病原性の Bvg⁻相に転換する。本研究課題において研究代表者らは、BvgS あるいは BvgA に作用して BvgAS 系を不活化する化合物を探索し、これを感染宿主に適用することにより人為的に百日咳菌を非病原性化し、結果として感染を制御するという方法論の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 百日咳菌の Bvg⁺相で特異的に発現する代表的な遺伝子として百日咳毒素遺伝子(*ptx*)と繊維状赤血球凝集素遺伝子(*fhaB*)、Bvg⁻相で特異的に発現する遺伝子として *vrgX* と *vrg73* (いずれも機能不明)を選び、そのプロモーター領域の下流に蛍光タンパク質 GFP 遺伝子を連結したベクターを作製して本菌に導入し、Bvg 相を区別できるレポーター菌株を作製した。

(2) 上記のレポーター株を米国食品医薬品局 (FDA) 承認済の化合物ライブラリー (1, 134 種) のそれぞれの化合物を混和した Bordet-Gengou 寒天培地に播種して培養し、培養後に生育したコロニーの GFP の発現強度から、Bvg 相転移に対する化合物の影響を検討した。

(3) (2)の結果から選び出した化合物 5 種を、Bordet-Gengou (BG) 寒天培地と Stainer-Scholte (SS) 液体培地にそれぞれ混和したのちに百日咳菌を培養し、GFP の発現強度を再度検討した。

(4) (2)および(3)の結果から、有望な化合物として選択した lonidamine を混和した Stainer-Scholte 液体培地で百日咳菌を培養し、リアルタイム PCR 法で *fhaB*, *prn*, *dnt*, *fim2*, *bscN*, *cyaA*, *ptx*, *vag8* (いずれも Bvg⁺特異的遺伝子) と *vrgX*, *vrg73* (Bvg⁻特異的遺伝子) の発現量を測定した。

(5) 以後、種々の条件における上記遺伝子の発現程度はリアルタイム PCR およびレポーターアッセイで評価した。

(6) BvgS の種々のドメインの組換えタンパク質を作製し、これらと lonidamine の結合を等温滴定型カロリメトリーで検出測定した。

4. 研究成果

(1) *vrgX* のレポーター株と FDA 承認済化合物ライブラリーを使用した BG 寒天培地培養での予備スクリーニングの結果、*vrgX* プロモーターの活性を刺激すると思われる 11 種の化合物を見出した。それぞれについて、例数を増やして再検討した結果、5 種の化合物で再現性よく *vrgX* プロモーターを刺激する活性が検出できた。

(2) 上記 5 種の化合物を混和した SS 液体培地と BG 寒天培地培養で再度 *fhaB*, *ptx*, *vrgX*, *vrg73* のレポーター株を培養して Bvg-転移活性を確認したところ、5 種のうち lonidamine のみが再現性よく全ての条件で本菌を Bvg-に転移させることがわかった。リアルタイム PCR による *fhaB*, *prn*, *dnt*, *fim2*, *bscN*, *cyaA*, *ptxA*, *vag8* (いずれも Bvg⁺特異的遺伝子) と *vrgX*, *vrg73* (Bvg⁻特異的遺伝子) の発現量測定においても上述と同様の結果を得ることができた (図 1)。

Lonidamine の最少有効濃度は 50 nM であった。

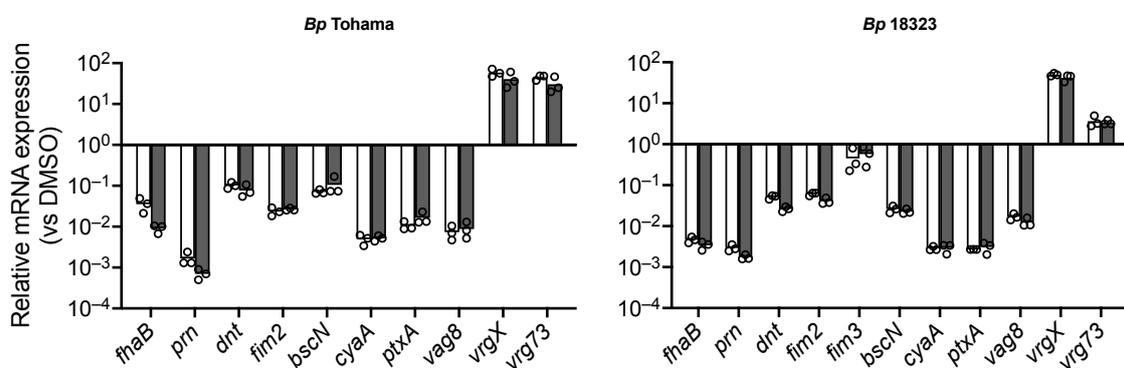


図 1: リアルタイム PCR による各遺伝子の発現量の評価. □: 既知の Bvg⁻誘導剤である MgSO₄ (50 mM) 存在下、■: Lonidamine (1 μM) 存在下で百日咳菌を培養 (SS 液体培地、37°C16 時間) した。Bvg⁺特異的遺伝子には発現減少が見られ、Bvg⁻特異的遺伝子には発現増加が見られる。

(3) Lonidamine は BvgS に活性化型変異が導入されて恒常的に Bvg⁺相に維持されている百日咳

菌変異株には作用しなかった。このことは、本剤が BvgS の下流の BvgA ではなく BvgS に直接作用していることを示している。

(4) BvgS の 2 種のペリプラズムドメイン、VFT1 および VFT2 のそれぞれの組換えタンパク質と lonidamine の結合を等温滴定型カロリメトリーで解析したところ、lonidamine は VFT2 に特異的に結合していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suzuki Koichiro, Hiramatsu Yukihiro, Nishida Takashi, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Immunization with autotransporter Vag8 prevents coughing induced by Bordetella pertussis infection in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.13066	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 Nugraha Dendi Krisna, Nishida Takashi, Tamaki Yuki, Hiramatsu Yukihiro, Yamaguchi Hiroyuki, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Survival of Bordetella bronchiseptica in Acanthamoeba castellanii	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.00487-23	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 Imamiya Risa, Shinohara Akari, Yakura Daisuke, Yamaguchi Takehiro, Ueda Koji, Oguro Ami, Minamiyama Yukiko, Ichikawa Hiroshi, Horiguchi Yasuhiko, Osada-Oka Mayuko	4. 巻 14
2. 論文標題 Escherichia coli-Derived Outer Membrane Vesicles Relay Inflammatory Responses to Macrophage-Derived Exosomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.03051-22	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 Ismanto Hendra S., Xu Zichang, Saputri Dianita S., Wilamowski Jan, Li Songling, Nugraha Dendi K., Horiguchi Yasuhiko, Okada Masato, Arase Hisashi, Standley Daron M	4. 巻 20
2. 論文標題 Landscape of infection enhancing antibodies in COVID-19 and healthy donors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Computational and Structural Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 6033 ~ 6040
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.csbj.2022.11.001	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 Ma Xingyan, Nugraha Dendi K., Hiramatsu Yukihiro, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 68
2. 論文標題 RpoN (sigma factor 54) contributes to bacterial fitness during tracheal colonization of <i>Bordetella bronchiseptica</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 36 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13109	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21件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha, 西田 隆司, 玉木 優生, 山口 博之, 堀口 安彦
2. 発表標題 Interaction between <i>Bordetella bronchiseptica</i> and <i>Acanthamoeba</i> as a transient host in the natural environment
3. 学会等名 第16回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大田 菜都子, 上野 俊哉, 平松 征洋, 堀口 安彦
2. 発表標題 百日咳菌のBvgASシステムを標的とした治療用化合物の探索
3. 学会等名 第16回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xingyan Ma, Dendi Krisna Nugraha, Yasuhiko Horiguchi
2. 発表標題 Genome-wide screening reveals essential genes required by <i>Bordetella bronchiseptica</i> for rat infection
3. 学会等名 第16回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shymaa Ali Saeed、Shimpei Gotoh、Takashi Nishida、Yasuhiko Horiguchi
2. 発表標題 Identification of virulence factors that are required for colonization of <i>Bordetella</i> during infection
3. 学会等名 第16回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田 隆司、平松 征洋、Dendi Krisna Nugraha、堀口 安彦
2. 発表標題 類鼻疽菌の病原性に関する遺伝子座の同定
3. 学会等名 第75回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha、西田 隆司、玉木 優生、山口 博之、堀口安彦
2. 発表標題 Interaction between <i>Bordetella bronchiseptica</i> and <i>Acanthamoeba</i> as a transient host in the natural environment
3. 学会等名 第75回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xingyan Ma、Dendi Krisna Nugraha、Yasuhiko Horiguchi
2. 発表標題 Genome-wide screening reveals essential genes required by <i>Bordetella bronchiseptica</i> for rat infection
3. 学会等名 第75回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大田 菜都子、上野 俊哉、平松 征洋、堀口 安彦
2. 発表標題 百日咳菌のBvgAS システムを標的とした治療用化合物の探索
3. 学会等名 第75回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shymaa Ali Saeed、Shimpei Gotoh、Takashi Nishida、Yasuhiko Horiguchi
2. 発表標題 Identification of virulence factors required for colonization of Bordetella during infection
3. 学会等名 第75回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 孝一朗、平松 征洋、西田 隆司、堀口 安彦
2. 発表標題 百日咳発症マウスモデルの開発ならびに新たなワクチン有効性評価系の構築
3. 学会等名 第26回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀口 安彦
2. 発表標題 細菌感染病理に関わる細菌毒素の作用機序についての研究
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha、西田 隆司、玉木 優生、平松 征洋、山口 博之、堀口 安彦
2. 発表標題 Interaction between <i>Bordetella bronchiseptica</i> and <i>Acanthamoeba</i> as a transient host in the natural environment
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Xingyan Ma、Dendi Krisna Nugraga、堀口 安彦
2. 発表標題 Genome-wide screening reveals essential genes required by <i>Bordetella bronchiseptica</i> in rat infection
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大田 菜都子、上野 俊哉、平松 征洋、堀口 安彦
2. 発表標題 Screening for compounds to control <i>Bordetella pertussis</i> infection by modulating the BvgAS system
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shymaa Ali Saeed、西田 隆司、後藤 慎平、堀口 安彦
2. 発表標題 ボルデテラ属細菌の感染初期の定着に必要な病原因子の同定
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀口 安彦
2. 発表標題 感染動物実験から見た百日咳における脳症と咳発作
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会（招待講演）
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 Dendi Krisna Nugraha、Hiroyuki Yamaguchi、Yasuhiko Horiguchi
2. 発表標題 Bordetella bronchiseptica utilizes Acanthamoeba castellanii as a temporal niche
3. 学会等名 第19回あわじ感染と免疫国際フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha、山口 博之、堀口 安彦
2. 発表標題 Bordetella bronchiseptica utilizes Acanthamoeba castellanii as a temporal niche
3. 学会等名 第74回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha、山口 博之、堀口 安彦
2. 発表標題 Bordetella bronchiseptica utilizes Acanthamoeba castellanii as a temporal niche
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀口 安彦
2. 発表標題 ボルデテラの毒素
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
研究 分担者	西田 隆司 (Nishida Takashi) (20845200)	大阪大学・微生物病研究所・助教 (14401)	
研究 分担者	平松 征洋 (Hiramatsu Yukihiro) (90739210)	大阪大学・微生物病研究所・助教 (14401)	

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
---------	---------