

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860328

研究課題名(和文)百日咳菌の環境適応戦略：単一塩基リピート長に影響を与える因子の解析

研究課題名(英文) *Bordetella pertussis* fimbriae are regulated by BvgAS system and Pfim structure

研究代表者

大塚 菜緒 (Otsuka, Nao)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：90596610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳菌 *Bordetella pertussis* の線毛(Fim)をコードする遺伝子 *fim2*、*fim3* は、2成分制御系 BvgAS および各プロモーター領域の poly(C) 長により発現制御を受けている。本研究で Pfim poly(C) 構造は、生育培地の組成等に影響を受けず比較的安定であることが判明した。また、*fim2* 遺伝子は Bvg+ 環境下で発現が上昇する virulence-activated genes (vag) であるが、*fim3* は Pfim3 poly(C) 長および Bvg+/- 環境条件により vag または virulence-repressed genes (vrg) に変化することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： *Bordetella pertussis*, the etiologic agent of whooping cough, produces two serologically distinct fimbriae, Fim2 and Fim3 either one or both. Expression of fimbrial genes *fim2* and *fim3* is regulated by the two component BvgAS system, and by the length of poly(C) tract in the promoter of each gene. In this study, we observed that the Pfim poly(C) distribution does not be affected by growing medium and antibacterial agents with sub-MIC. In the Bvg+ phase, *B. pertussis* virulence-activated genes (vags) are up-regulated, and virulence-repressed genes (vrgs) are down-regulated. We confirmed that *fim2* gene is a vag as previous studies reported, but *fim3* behaved as either a vag or vrg, depending on the Pfim3 poly(C) length and Bvg state.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳菌 fimbriae 発現機構

1. 研究開始当初の背景

百日咳菌 *Bordetella pertussis* は小児を中心に急性呼吸器感染症である百日咳を引き起こす。百日咳は VPDs (vaccine preventable diseases: ワクチン予防可能疾患)の一つとされ、百日せきワクチンの導入以降、世界各国で百日咳患者数は激減した。しかし近年、日本を始めとする先進諸国で、ワクチン既接種者である成人・青年層での百日咳罹患者増加が認められており、新たな問題となっている。百日咳菌は百日咳毒素(PT)、繊維状赤血球凝集素(FHA)、パータクチン(Prn)、線毛(Fim)など様々な病原因子を産生し、一部はワクチン抗原として利用されている。ところがワクチン導入以降、百日咳菌流行株においてワクチン抗原をコードする遺伝子(*ptxA*, *prn*, *fim2*, *fim3* など)に遺伝子多型変異が進行している。このような抗原変異の進行は、百日咳菌のワクチン免疫回避につながり、百日咳感染症再興の一因でもであると指摘されている。

このような背景のもと、我々は国内臨床分離百日咳菌の分子疫学解析を行ってきた。その結果、わが国では1997年に初めて定着因子である Prn の発現欠損株が臨床分離されて以来、その分離割合が増加し続け、2009年には分離株の約30%が Prn 欠損株であることを見出した(Otsuka et al, 2012, PLoS One)。その後、Prn 欠損株の分離報告は他の先進諸国からも報告が相次ぎ、特にアメリカおよびオーストラリアでは近年臨床分離される百日咳菌株の70~80%が Prn 欠損株となっている。我々の検討から、Prn 欠損株は Prn 発現株に比べて増殖に有利な性質を備えていることが判明しており、今後さらに百日咳菌 Prn 欠損株が拡大する可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、Prn と同様に百日せきワクチンのワクチン抗原として利用される Fim の発現・産生機構に注目した。百日咳菌ゲノムには *fim2*, *fim3*, *fimX* という3つの *fim* 遺伝子が存在するが臨床分離株では Fim2 かつ/または Fim3 タンパク質のみを産生する。各菌株における Fim 産生パターンは菌型別に利用されており Fim2 株、Fim2/3 株、Fim3 株、Fim(-)株と4つの Fim 血清型に分類することができる。*fim* 遺伝子は、そのプロモーター領域(Pfim)に C が連続した特徴的な poly(C)配列を含んでおり、この poly(C)長が *fim* 遺伝子発現の ON/OFF に影響を与える(図1)。百日咳菌は恒常的に poly(C)長に「ゆらぎ」を持たせており、これは生育環境に適した個体を残す適応戦略の一つだと考えられてきた。

また、*fim* 遺伝子は2成分制御系 BvgAS によっても発現が制御されている。これまでに、*fim2* 遺伝子は BvgAS が働く環境下(Bvg+)で発現することが示されてきたが、*fim3* 遺伝子に関しては Bvg+ で発現するか、BvgAS が働かない環境下(Bvg-)で発現するかについて一致した見解が得られていなかった。

BvgAS は Fim 以外の様々な病原因子の発現も制御しており、Bvg+ で発現が上昇する遺伝子は *vag* (virulence-activated genes)、Bvg- で発現が上昇する遺伝子は *vrg* (virulence-repressed genes)と呼ばれている。

本研究では Pfim poly(C)長に影響を与える因子の探索、および *fim* 遺伝子の *vag/vrg* を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DNA シーケンス解析: 常法に従い目的領域を PCR 増幅し、その塩基配列をキャピラリーシーケンサー3130xl または 3730 Genetic Analyzer により決定した。得られた塩基配列断片は SEQUENCHER DNA sequencing software (Gene Codes Co.)を用いてアセンブリを行い、塩基配列を決定した。

(2) Pfim poly(C)長分布の解析: 百日咳菌株の Pfim2 poly(C)または Pfim3 poly(C)長分布は PCR-ligase detection reaction (LDR)法を用いて解析した。各プロモーター領域を Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)を用いて PCR 増幅し、増幅フラグメントを次の LDR の鋳型として用いた。LDR は 5'リン酸化-3'FAM 標識および非標識オリゴヌクレオチドを組み合わせ、Taq DNA ligase (NEB)を用いて30サイクル行った(95°C 2分, 95°C 15秒, 58°C 2分)。反応は0.5 mM EDTA を添加して停止させた。その後、合成された FAM 標識オリゴヌクレオチドを3130xlにて解析し、各 poly(C)長のピークエリア面積を GeneMapper ソフトウェアにて決定した。

(3) 遺伝子発現解析: *fim2*, *fim3*, *ptxA*, *vrg-6* の mRNA 発現量は RT-qPCR にて測定した。百日咳菌を OD650=1.0 まで振盪培養し、TRIzol Reagent (Life technologies)を用いて Total RNA を抽出した。DNase I 処理をしたのち、real-time PCR にて抽出 RNA に DNA の混入が無いことを確認した。RT-qPCR には LightCycler® RNA Amplification Kit SYBR Green I を用い、55°C の逆転写反応1サイクルに続けて40または45サイクル増幅反応を行った。測定機器には Roche LightCycler 480 II を用いた。なお、*recA* 遺伝子発現量を内部標準として用いた。

(4) Fim 産生解析: 百日咳菌の *fimbriae* タンパク質産生は ELISA により解析した。1%カザミノ酸液で菌液を調製し、56°C で1時間加熱処理したのち、PBS で希釈した。希釈菌液を100 µl/well ずつ96穴イムノプレートに添加し、25°C で1晩静置した。洗浄後、1% FBS-PBS を150 µl/well 添加し、25°C で1時間静置した。洗浄後、ビオチン標識した抗 Fim2 または Fim3 モノクローナル抗体(100倍希釈)を100 µl/well 添加し、25°C で2時間静置した。洗浄後、streptavidin-HRP(10,000倍希釈, Thermo scientific)を各100 µl/well 添加した。25°C で30分反応後にプレートを洗浄し、1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate (Thermo scientific)により15分間発色させた。2M 硫酸

酸で反応を停止した後,450 nm の吸光度を測定した。Fimbriae 発現の陽性コントロール菌株として、Fim2 および Fim3 をともに産生する百日咳菌 18323 株を用いた。

4. 研究成果

(1) Pfim poly(C)解析用 PCR-LDR 法の構築

Pfim2 および Pfim3 に存在する poly(C)長の分布を解析する手法として、PCR/LDR 法を構築した。現行百日咳せきワクチンのワクチン株である Tohama 株は Fim2 のみを産生し、Fim3 を産生しない。図 2 に示す通り、百日咳菌 Tohama 株の Pfim3 poly(C)は非発現長とされる 13C が分布のピーク (Peak area, 62.1%) となっており、これが Fim3 を産生しない要因であると指摘された。ただし、発現長とされる 14C も全体の 14%程度存在していたことから、発現長 poly(C)がある一定割合以上存在することが *fim* 遺伝子発現には必要であることが示唆された。

(2) 生育環境が Pfim poly(C)長に与える影響

Pfim3 poly(C)長に影響を与える環境因子の探索として、まずは 2 種類の生育培地で比較した。百日咳菌を cyclodextrin solid medium (CSM)培地および馬脱織血加 Bordet-Gengou (BG)寒天培地で培養し、Pfim poly(C)長分布および Fim 産生量を比較した。その結果、いずれの菌株も Pfim poly(C)長分布に変動はなく、Fim 産生量に関しても統計学的な有意差を示さなかった。次に抗菌薬が Fim 産生に与える影響を解析した。百日咳菌を sub-MIC 濃度 (0.01 µg/ml)の各種抗菌薬(EM, CAM, AZM, ABPC, KM, SM, NFLX, NOV, TC)を含む BG 培地で培養し、抗菌薬不含 BG で生育させた場合と比較した。しかし、上記抗菌薬存在下では Fim2, Fim3 の Pfim poly(C)長分布およびタンパク質産生には影響が認められなかった。

(3) *fim2*, *fim3* 遺伝子の発現制御機構

各種血清型に分類される百日咳菌臨床分離株を用いて、Bvg+/Bvg-環境下における *fim2* および *fim3* の DNA, mRNA, タンパク質レベルでの解析を行った。百日咳菌は modified Stainer Sholte (mSS)で培養した場合 Bvg+ phase として、mSS+50 mM MgSO₄ で培養した場合 Bvg- phase として各種遺伝子の発現が変化する。Bvg+および Bvg-環境は *vag* および *vrg* として知られる *ptxA* および *vrg-6* 遺伝子の発現測定により確認した。まず、*fim2* 発現に関しては、Pfim2 poly(C)の主要長が 12C 以上の場合、Bvg+で遺伝子発現が上昇し、Bvg-では発現が減少した。また、Fim2 タンパク質産生も遺伝子発現と一致していた。すなわち、これまでの報告と同様に *fim2* は *vag* であるということが確認された。また、Pfim2 poly(C)が発現長 12C 以上をとる菌株は Fim2 または Fim2/3 であることが新たに判明した。

一方 *fim3* は *fim2* に比べ複雑な発現機構を有することが見出された。まず、Fim3 タンパク質産生は Pfim3 poly(C)の主要長が 13C 以下

の菌株は検出されず、14C 以上の菌株は Bvg+ の場合検出され、Bvg-の場合検出されなかった。また、mRNA レベルでも Pfim3 poly(C)が 14C 以上の場合、*fim3* 遺伝子が *vag* として働くことが明らかとなった。ところが、Pfim3 poly(C)が 13C 以下の場合であっても、mRNA レベルでは Bvg-環境下で *fim3* 遺伝子の発現上昇が認められた。すなわち、*fim3* は *vrg* として働くことが新たに明らかとなった。*fim3* mRNA レベルの上昇が見られるのに対し、Fim3 タンパク質が検出されなかったことから、Fim を菌体外に輸送するアクセサリータンパク質の Bvg- phase における産生減少が考察された。

以上のことから、百日咳菌 Fim は生育培地や sub-MIC 濃度の抗菌薬によっては発現に影響を受けず、各菌株における Fim 血清型は比較的安定していることが明らかとなった。また、これまで一致した見解のなかった *fim* 遺伝子の発現機構、特に *fim3* 発現の制御について新たな知見を得た。本研究では、百日咳治療やワクチン開発面への応用性のある基礎的な研究成果を得ることができた。

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 2 件)

Miyaji Y, Otsuka N, Toyozumi-Ajisaka H, et al. Genetic Analysis of Isolates from the 2008-2010 Pertussis Epidemic in Japan. PLoS One 2013; 8: e77165

DOI: 10.1371/journal.pone.0077165

Galit SR, Otsuka N, Furuse Y, et al. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in the Philippines in 2012-2014. Int J Infect Dis 2015; 35: 24-26

DOI: 10.1016/j.ijid.2015.04.001

〔学会発表〕(計 3 件)

大塚菜緒, 中村幸嗣, 豊泉裕美, 岡田賢司, 柴山恵吾, 荒川宜親, 蒲地一成. 抗 Vag8 IgM-capture ELISA 法を用いた百日咳血清診断法の開発. 第 87 回日本感染症学会学術講演会. 2013 年 6 月 5~6 日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Otsuka N, Nakamura Y, Yamazaki M, Gondaira F, Okada K, Miyaji Y, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Arakawa Y, Kamach K. A novel IgM-capture ELISA assay using recombinant Vag8 fusion protein for accurate diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. 10th International Bordetella

symposium. 2013年9月8~11日. ダブリン(アイルランド).

Otsuka N, Bouchez V, Shibayama K, Kamachi K, Nicole Guiso. *Bordetella pertussis* fimbriae are regulated by BvgAS system and Pfim structure. 第88回日本細菌学会総会. 2015年3月28日. 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市).

〔図書〕(計1件)

大塚菜緒, 蒲地一成. 百日咳. 化学療法の領

域 2013; 29: 973-981

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 菜緒 (OTSUKA, Nao)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号: 90596610

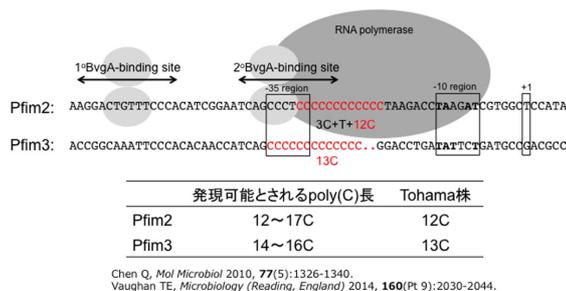


図1 百日咳菌 Tohama 株の fim 遺伝子プロモーター構造

Pfim2 poly(C)は12~17C, Pfim3 poly(C)は14~16Cの場合, 各 fim 遺伝子の発現が可能であると報告されている。百日咳菌 Tohama 株ゲノム情報では, Pfim2 poly(C)および Pfim3

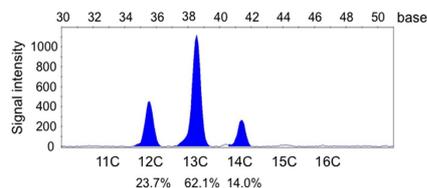


図2 百日咳菌 Tohama 株の Pfim3 poly(C)長分布

PCR/LDR 法を行い, キャピラリー電気泳動を行ったのち, GeneMapper ソフトウェアを用いて解析を行った。百日咳菌 Tohama 株の Pfim3 poly(C)は非発現長である13Cが62.1%と主要であったが, 12C および14C 長もそれぞれ23.7%, 14%含まれていた。

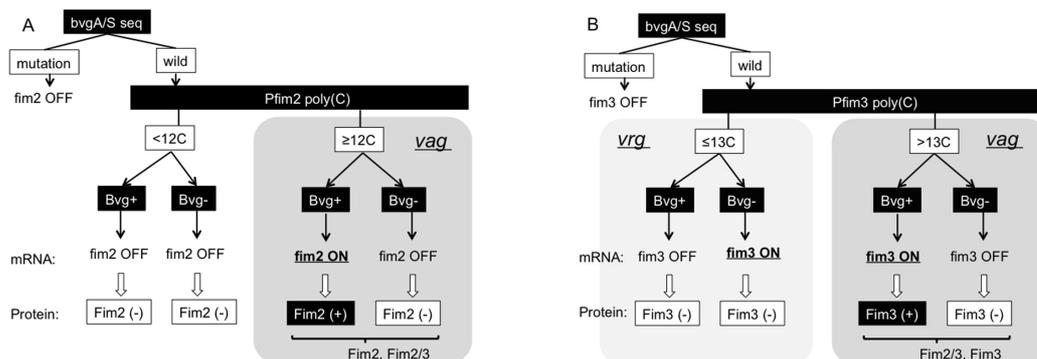


図3 百日咳菌 Fim の遺伝子発現およびタンパク質産生機構

A. *fim2* 発現機構, B. *fim3* 発現機構。 *fim2* は Pfim2 poly(C)の主要長が12C以上で *vag* として働く。 *fim3* は Pfim3 poly(C)主要長が13C以下で *vrg*, 14C以上で *vag* となる。