

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460525

研究課題名(和文) ラット気管で特異的に発現する気管支敗血症菌遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of *B. bronchiseptica* gene products specifically induced in rat trachea

研究代表者

安倍 裕順 (Abe, Hiroyuki)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00379265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多くの哺乳動物の呼吸器官に感染する宿主域の広い気管支敗血症菌はヒトにのみ感染する百日咳菌やパラ百日咳菌の祖先菌と考えられている。比較ゲノム解析から、これら3菌種間の特定の遺伝子の存否や遺伝子の菌種特異的な配列の違いが、感染宿主域を規定しているかもしれないことが示唆されていた。本研究では、これら3菌種のどのような遺伝的背景の違いが感染宿主域を規定するのか明らかにする目的で、気管支敗血症菌がラット気管感染中に発現する遺伝子の欠損株および気管支敗血症菌特異的な遺伝子領域の大規模欠損株を作製し、ラット気管への感染定着能への影響を検討したが、野生株と変異株間に大きな違いが認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Bordetella bronchiseptica, a Gram-negative pathogenic bacterium causing respiratory infections in a broad range of mammals, is considered to have an evolutionary progenitor-like relationship to Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis, which are causative agents of pertussis in humans. Previous comparative genomic analysis revealed that genetic differences may be associated with adaptation to the different hosts and different manifestations of disease. To get a clue to understand the underlying genetic differences associated with broad host range of *B. bronchiseptica*, we constructed several deletion mutant of genes specifically induced in rat trachea or with long-range deletion of *B. bronchiseptica* specific gene loci and examined whether these loci are involved in bacterial colonization of rat trachea. However, no apparent difference was found between wild-type *B. bronchiseptica* and mutants in its ability to establish respiratory infection in rats.

研究分野：病原細菌学

キーワード：病原生遺伝子 百日咳菌 気管支敗血症菌

1. 研究開始当初の背景

ボルデテラに属する百日咳菌、パラ百日咳菌、気管支敗血症菌はいずれも哺乳動物の上部気道に感染する病原細菌である。いずれも、ほぼ同一の病原因子を産生するが、その宿主特異性や病態は明らかに異なる。百日咳菌は痙攣性の咳発作を特徴とする百日咳の原因菌であり、ヒトにのみ感染し急性気道感染を起こす。一方、気管支敗血症菌は哺乳類できわめて広い宿主域を持ち、慢性持続感染を起こす。パラ百日咳菌は、菌株によってヒトに感染する株とヒツジに感染する株があり、百日咳に比べて持続期間の短い感染を起こす。全ゲノム配列解析の結果から、百日咳菌の祖先種は気管支敗血症菌に近縁で、そこから多数の遺伝子の欠失と転移が繰り返されて、パラ百日咳菌と百日咳菌に分岐進化したと推定されている。また、気管支敗血症菌に比べて百日咳菌が新たに獲得したと思われる遺伝子はきわめて少ない。これらのことから、気管支敗血症菌と百日咳菌の宿主特異性や感染病態の違いは、分岐進化の過程で欠失や転移したために両菌の間で機能や発現量が著しく変化した遺伝子や、あるいは欠失した遺伝子そのものに起因すると考えられている。ゲノム配列によると、少なくとも気管支敗血症菌に存在するが百日咳菌やパラ百日咳菌では見られない遺伝子は602種存在することがわかっている。この602遺伝子のうちでも、さらに実際に感染時に発現する遺伝子のなかに上記のような気管支敗血症菌と百日咳菌の異なる性状の責任遺伝子があると考えられた。申請者は、そのような遺伝子群を探索するために、平成22-24年度基盤(C)(一般)研究「細菌表面提示蛋白質を利用した改良型IVET法の開発」の研究課題で助成を受け、感染宿主内で発現誘導される遺伝子の網羅的探索を可能にする改良型IVET法(IVET-IP(*in vivo* expressed-tag immunoprecipitation)法)を開発し、ラットへの感染過程において高発現(試験管培養時に比べて2倍以上)する、気管支敗血症菌に特異的な28種の遺伝子を同定することができた。上述のように、この28遺伝子のなかに、気管支敗血症菌に特有の、広範な宿主への慢性持続感染に関与する遺伝子が存在する可能性が高い。

そこで本研究課題ではこれまでの研究をさらに発展させて、同定した28種の遺伝子の機能解析を進め、気管支敗血症菌感染におけるそれぞれの遺伝子の役割を解明する。またその知見から、なぜ、百日咳菌(あるいはパラ百日咳菌)と気管支敗血症菌で、宿主特異性や病態が著しく異なるのかについての理解を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、感染宿主内で発現誘導される細菌遺伝子の感染成立における役割を明らかにすることである。申請者は実験動物の感

染モデルで特異的に発現する細菌遺伝子探索のために改良型IVET法(IVET-IP法)を開発し、気管支敗血症菌(*B. bronchiseptica*)のラット感染モデルを用いて、気管感染時の菌の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析することに成功した。その成果を土台にして、本研究課題では、感染経過中に特徴的に発現が変動する菌側の遺伝子の中から感染成立に関与する遺伝子を見つけ出し、これらの遺伝子産物の機能解析をすすめ、感染成立における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、ラットへの感染過程で高発現する、気管支敗血症菌に特異的な28遺伝子を欠失させた変異株を作製し、それぞれの変異株のラット感染能を検討する。その結果、感染能が低下した(あるいは変化のあった)変異株で欠失している遺伝子を、その塩基配列から推定される機能によって分類し、それぞれについてさらに適当な方法で機能解析する。それらの結果を総合し、気管支敗血症菌感染におけるそれぞれの遺伝子の役割を解明することを目指した。

4. 研究成果

遺伝子欠損によってラット気管への定着能が野生株に比べて低下する転写制御遺伝子を大量発現する気管支敗血症菌株を構築し、分泌タンパク質のプロファイルを野生株と比較した。野生株と分泌量が著しく異なるタンパク質の質量解析から二種の転写制御遺伝子大量発現株は野生株に比べて培養上清中へのACT, FhaB, BipAなどの病原因子およびFhaS, BatBなどのタンパク質の分泌量の著しい増加を誘導することを見出した。一方、気管支敗血症菌に特異的な転写制御遺伝子の百日咳菌への遺伝子導入株を構築し、上記と同様の解析から二種の転写制御遺伝子の大量発現株は野生株に比べて培養上清中へのACTの分泌の著しい増加が認められた。これらの結果は気管支敗血症菌がラット気管定着時に百日咳菌が保持していない転写制御因子による病原性遺伝子発現制御を利用していることを示唆しており、両菌種の感染宿主域や感染病態の違いが実際の感染宿主内での遺伝子発現プロファイルの違いに起因する可能性が考えられた。

感染ラットの気管で発現する気管支敗血症菌特異的な鉄関連遺伝子欠損株は野生株に比べてラット気管への感染定着能が低下することを見出した。

上述の転写制御因子および鉄関連遺伝子が気管支敗血症菌株間で保存されているかど

うかボルデテラ属細菌(気管支敗血症菌 62 株、パラ百日咳菌 2 株、百日咳菌 40 株)のゲノム配列情報と blast 検索プログラムを用いて探索したところ、これらの遺伝子はすべての気管支敗血症菌株で保温されており、パラ百日咳菌、百日咳菌株間では保存されていないことを確認した。また、これらの遺伝子の周辺領域はゲノム上に気管支敗血症菌特異的な遺伝子塊を形成することも見出した。一方、以前の比較ゲノム解析の報告から気管支敗血症菌特異的な遺伝子とされてきた遺伝子群も、今回の比較解析から必ずしも特異的でないという結果が得られた。研究材料の選定のために、気管支敗血症菌特異的な遺伝子の分類の再調査を行ったところ、既知の特異的とされた 602 遺伝子は 249 遺伝子はファージ由来の遺伝子であり、気管支敗血症菌株間で保存はされていないこと、残りの遺伝子のうち 280 遺伝子は菌染色体上に 7 つの遺伝子塊を形成していた。7 つの遺伝子塊をそれぞれ欠損させた株を構築して、ラット感染モデルに供したところ、いずれの欠損株の感染定着能も野生株と同等であることが示された。この結果は気管支敗血症菌特異的な遺伝子塊領域の遺伝子発現だけでラット気管への感染定着に大きな寄与をしていないことを示唆している。

気管支敗血症菌と類縁菌種の遺伝子のアミノ酸配列の違いに注目して比較ゲノム解析を進めたところ、菌種内で保存されているが、菌種間では保存されていないアミノ酸置換を見出すことができた。特に気管支敗血症菌を含むボルデテラ属細菌の主要な病原性因子である鞭毛、毒素、付着因子等に菌種特異的なアミノ酸置換が多数見出されたことから、感染成立たいする菌種特異的な変異による機能的な相違に今後注目したい。

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 7 件)

Okada K, Abe H, Ike F, Ogura Y, Hayashi T, Fukui-Miyazaki A, Nakamura K, Shinzawa N, Horiguchi Y, Polymorphisms influencing expression of dermonecrotic toxin in *Bordetella bronchiseptica*, PLOS ONE, 査読有, Vol.10(2), 2015, e0116604, DOI:10.1371/journal.pone.0116604

Okada K, Ogura Y, Hayashi T, Abe A, Kuwae A, Horiguchi Y, Abe H, Complete genome sequence of *Bordetella bronchiseptica* S798, an isolate from a pig with atrophic rhinitis, Genome Announcements, 査読有, Vol.2(3), 2014, e00436-14,

DOI:10.1128/genomeA.00436-14

安倍裕順, 相川知宏, 中鉢淳, 宮腰昌利, 丸山史人, 感染特異的遺伝子発現ネットワークからの新展開, 日本細菌学雑誌, 査読有, Vol. 69(3), 2014, pp. 539-546, DOI: 10.3412/jsb.69.539

Suzuki K, Mizushima H, Abe H, Iwamoto R, Nakamura H, Mekada E, Identification of diphtheria toxin R domain mutants with enhanced inhibitory activity against HB-EGF, J Biochemistry, 査読有, 2014, pp. 1-13, DOI:10.1093/jb/mvu079

Sudo N, Soma A, Muto A, Iyoda S, Suh M, Kuniyama N, Abe H, Tobe T, Ogura Y, Hayashi T, Kurokawa K, Ohnishi M, Sekine Y, A novel small regulatory RNA enhances cell motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli*, J Gen Appl Microbiol, 査読有, Vol.60(1), 2014, pp. 44-50, DOI:http://dx.doi.org/10.2323/jgam60.44

Abe H, Kamitani S, Fukui-Miyazaki A, Shinzawa N, Nakamura K, Horiguchi Y, Detection of genes expressed in *Bordetella bronchiseptica* colonizing rat trachea by in vivo expressed-tag immunoprecipitation method, Microbiology and Immunology, 査読有, Vol.59, 2015, pp. 249-261, DOI:10.1111/1348-0421.12247

Nishikawa S, Shinzawa N, Nakamura K, Abe H, Horiguchi Y, The bvg-repressed gene *brtA*, encoding biofilm-associated surface adhesion, is expressed during host infection by *Bordetella bronchiseptica*, Microbiology and Immunology, 査読有, Vol.60, 2016, pp.93-105, DOI:10.1111/1348-0421.12356

[学会発表](計 3 件)

Okada K, Abe H, Ogura Y, Hayashi T, Abe A, Kuwae A, Horiguchi Y, Complete genome sequence of *Bordetella bronchiseptica* S798, an isolate from a pig infected with atrophic rhinitis, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2014 年 9 月 23 日-26 日, 奈良県新公会堂

岡田圭佑, 安倍裕順, 小椋義俊, 林哲也, 堀口安彦, 気管支敗血症菌の皮膚壊死毒素 DNT の産生量に関わる塩基多型の解析, 第 67 回日本最近学会関西支部総会, 2014 年 11 月 22 日, 兵庫医科大学

Abe H and Horiguchi Y, Seven large loci specific to *Bordetella bronchiseptica* are not required for bacterial colonization in

rat trachea, 第 14 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2015 年 9 月 8 日-11 日, 兵庫県淡路夢舞台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安倍裕順 (ABE Hiroyuki)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00379265

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者