

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07095

研究課題名(和文) 肺パスツレラの細菌分類の再編と病原因子に基づく検出法の開発

研究課題名(英文) Reclassification of [*Pasteurella*] pneumotropica and detection of virulence determinants.

研究代表者

佐々木 啓 (Sasaki, Hiraku)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・准教授

研究者番号：20384969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は肺パスツレラの細菌分類再編と病原因子解析を目的とする予定であったが、採択年の秋にコペンハーゲン大学から肺パスツレラの大規模な分類再編がなされオンライン版で公表された。そのため、本研究では目的の方向性を変え、新たな肺パスツレラとその近縁種の病原因子の評価を行うことを目的とした。その結果、YadAという接着タンパク質、Cdiという細菌同士の制御タンパク質、Lspの宿主細胞に入るとリン酸化される毒素タンパク質、近縁種に分布するRTX毒素などを同定した。また、近縁種の感染実験をしたところ、RTX毒素陽性株は免疫不全動物に対して肺炎を起こす菌株もいることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該研究では、肺パスツレラの再編を狙っていたが、同時にヨーロッパでもその機運が高まっていた時期であり、他研究機関によって分類再編がなされた。しかしながら、基本的な肺パスツレラ検出法や病原性はいまだ明確化されておらず混乱しているため、病原性解析を主体に研究を行ってきた。近年、真正細菌で同定された細菌同士の増殖抑制機構や宿主細胞でのリン酸化機構があることは肺パスツレラの病原性指標や検出法の参考に出来ることであり、実験動物感染症における新たな知見の集積になったと考えられる。今後はこの基礎データをさらに発展させることが望まれる。

研究成果の概要(英文)：This study has attempted to conduct on reclassification of rodent *Pasteurella* and development of identification methods regarding virulent determinants. In initial stage of the study period, however, formal reclassification of rodent *Pasteurella* was completed and published from Univ. Copenhagen. Based on the announcement, formally named [*Pasteurella*] pneumotropica had been reclassified as *Rodentibacter pneumotropicus* and *R. heylii*. The strategy of study was forced to change, and thus, the virulence factors of *Rodentibacter* and the related species were further identified and evaluated their ubiquitous pathogenicity toward mammal cells. Of these results, Yersinia-adhesin A, contact-dependent inhibition system-related proteins and tyrosine-phosphorylated protein in host immune cells were identified in *Rodentibacter*. Further, a part of wild-type *Rodentibacter* sp. that possess RTX toxin was confirmed to induce pneumonia in immunodeficient rodent.

研究分野：微生物学

キーワード：肺パスツレラ

1. 研究開始当初の背景

Pasteurella pneumotropica (以下、肺パスツレラ)は、げっ歯類を宿主とするパスツレラ科に属するグラム陰性の短桿菌である。国内外の実験動物から頻繁に分離される細菌であり、実験動物の管理上、対策を講ずるべき重要な病原体の一つである。肺パスツレラは、げっ歯類の呼吸器官、結膜、消化管、膣などに感染・定着し、宿主に様々な症状を起こす。肺パスツレラの感染は、免疫系が正常な個体の場合はほとんどが不顕性感染である。しかし、免疫不全の固体やほかの病原体との重複感染の場合には、重篤な肺炎、敗血症など様々な症状を引き起こす。

近年、実験動物には SPF 管理の下で免疫不全動物が普及してきているが、とりわけこれらの動物に対しては肺パスツレラの感染や伝播を阻止する必要がある。実験動物への肺パスツレラの感染防止には、微生物モニタリングの頻度を高め、検出された場合には動物のクリーニングの措置が執られる。この微生物モニタリングは、国内では生化学性状を基に菌種を同定し、それでも未確定の場合には PCR などで判断することが推奨されている。しかしながら、この方法から実際に分離される野生株は表現型/遺伝型ともに多様性が高く、肺パスツレラの標準株の性状と大きくかけ離れている菌株が多い。とくにリボソーム小サブユニット (16S rRNA) をコードする遺伝子の配列は一菌種としては異常なほど多様化しており、微生物モニタリングの混乱の原因ともなっている。さらに、生化学性状や PCR などの判定で肺パスツレラと同定されたすべての菌株がげっ歯類に対して病原性を持つかどうかは不明である。以上のような理由から、肺パスツレラと同定方法の見直しは急務であり、細菌分類や病原因子に基づいた判断基準の開発が望まれる。

一方、肺パスツレラの病原因子として、様々な因子が同定されてきた。とくに先頃終了した biotype Jawetz の標準株のドラフトゲノム解析では、4 種の RTX 毒素、複数種の高分子血球凝集素、溶血素、6 型分泌装置などが病原性を担うことが明らかになった。当該申請者は、さらに biotype Heyl の標準株のドラフトゲノム解析を行った。両者の biotype ではゲノムサイズと遺伝子数が同じ菌種としてはかなり異なるが、約 70~80% の遺伝子がともに相同性が高く共通していることが示される。この遺伝子群の中でも共通する病原因子に関与する遺伝子は 80 ほどであり、先に同定された biotype Jawetz の病原因子にほぼ付随するものであった。とくに相同性が高いのは、RTX 毒素、高分子血球凝集素などであり、肺パスツレラとその近縁種の病原体に普遍的に存在するものと考えられる。また、それぞれのタンパク質の機能や病原機構についても明らかにされつつある。

2. 研究の目的

本研究では、肺パスツレラの細菌分類再編とともに、肺パスツレラの病原因子を明らかにし、検出法に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

肺パスツレラゲノム解析

次世代シーケンサー (NGS) を用いたドラフトゲノム比較解析を行い、基準株-標準株間において比較解析を行い、普遍的な病原因子について同定する。

病原因子の解析

上記のドラフトゲノム解析で同定された病原性を示すと考えられるタンパク質について、げっ歯類細胞を用いて細胞傷害性や、宿主細胞内における動態を解析する。

細菌同士の増殖抑制の解析

組換え大腸菌を用い、肺パスツレラの増殖抑制タンパク質とその受容体を誘導発現したときの増殖動態を解析する。

近縁種のゲノム解析

肺パスツレラ近縁種の病原因子を特定するためドラフトゲノム解析を行い、比較ゲノム解析で肺パスツレラとの病原因子の差異を明確にする。

近縁種の免疫不全マウスに対する病原性解析

近縁種でも肺パスツレラと共通する病原因子を持つ菌株の感染実験を、免疫不全マウスを用い、エンドポイントを設けた実験のもとで動物に対する病原性を検討する。

4. 研究成果

本研究の目標の一つは肺パスツレラの細菌分類再編であったが、2016 年秋にベルギーとオランダの研究グループによってパスツレラ科細菌分類再編がオンラインで発表された (Int J Syst Evol Microbiol. 2017 Jun;67(6):1793-1806.)。そこで本研究では、肺パスツレラの病原性因子の解析と細菌分類再編の際に近縁種となった菌株の病原性に注目し研究を遂行することとした。

基準株ならびに標準株のドラフトゲノム解析結果から、Yersinia-adhesin A (YadA)、Contact-dependent growth inhibition (Cdi)、宿主細胞内でリン酸化を受けると考えられる Large supernatant protein (Lsp) をコードする遺伝子が見出された。YadA については、ほぼすべての肺パスツレラやその近縁種が普遍的に保持しており、細胞外マトリックスや繊維が細胞などに接着する役割を担うことが明らかになった。Lsp については、AMPylation といった最近明らかになった病原機構が関与しており、マウスマクロファージ内に侵入するとリン酸化されることが確認された。しかしながら、そのリン酸化後にどのように宿主に利用されるかまでは明らかには出来なかった。

また、Cdi については、肺パスツレラの野生株にも広く分布しており、菌株ごとに相同性が低いことがわかった。基準株の Cdi システムについて大腸菌を用いて組換えタンパク質で誘導発現させたとき、発現した大腸菌自体が死滅していくことがわかった。このことから、同株と異株を認識し、コロナイズするときに同株だけが優占的になるための手段であると推察された。

肺パスツレラ近縁種にも共通する病原因子がないか調べるため、ドラフトゲノム解析を行った。2009 年に我々が同定した RTX 毒素を産生する近縁種の野生株が存在することがわかった。この RTX 毒素の構造は、従来の肺パスツレラよりも、強毒型と言われる豚胸郭膜肺炎菌や腸管出血性大腸菌と類似した構造を持っていた。この野生株について免疫不全マウス (Rag2) を用いて感染実験を行ったところ、20% の個体が肺炎を起こした。このことから、肺パスツレラ基準株ほど病原性が高いとは考えられないが、免疫不全マウスに対して何らかの影響を及ぼすと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 佐々木啓	4. 巻 68
2. 論文標題 実験動物感染症の現状：肺バクテリヤの細菌分類再編と微生物モニタリング	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験動物ニュース	6. 最初と最後の頁 26-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Kawamoto E, Sasaki H, Kanai T, Ueshiba H.	4. 巻 5(3)
2. 論文標題 Experimental Contact Infection of NOD/ShiJic-scid mice with Pasteurella pneumotropica.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 SOJ Microbiology and Infectious Disease	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15226/sojmid/5/3/00172	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 Sasaki H, Ishikawa H, Terayama H, Asano R, Kawamoto E, Ishibashi H, Boot R.	4. 巻 September
2. 論文標題 Identification of a virulence determinant that is conserved in the Jawetz and Heyl biotypes in [Pasteurella] pneumotropica.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomedical Advances (http://biomedical-advances.org/inf-20175-26/)	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 Ishikawa H, Fukui T, Ino S, Sasaki H, Awano N, Kohda C, Tanaka K	4. 巻 499
2. 論文標題 Influenza virus infection causes neutrophil dysfunction through reduced G-CSF production and an increased risk of secondary bacteria infection in the lung.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2016.08.025.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki H, Ishikawa H, Terayama H, Asano R, Kawamoto E, Ishibashi H, Boot R	4. 巻 74
2. 論文標題 Identification of a virulence determinant that is conserved in the Jawetz and Heyl biotypes in [Pasteurella] pneumotropica.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Pathogens and Disease	6. 最初と最後の頁 ftw066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femspd/ftw066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 3.Sasaki H, Ueshiba H, Kawamoto E, Boot R	4. 巻 1
2. 論文標題 [Pasteurella] pneumotropica as a potential mouse infection model for assessment of substantial opportunistic bacterial infections.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical and Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15344/2456-4028/2016/115	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 該当する

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梶田亜矢子、仲柴俊昭、吉木 淳、佐々木 啓、池 郁生
2. 発表標題 複数遺伝子座の塩基配列情報を用いた肺パストツレラ分離株解析
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池 郁生、梶田亜矢子、仲柴俊昭、中田初美、小幡裕一、佐々木 啓、吉木 淳
2. 発表標題 肺パストツレラのゲノム塩基情報の整理
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木啓
2. 発表標題 肺バクテリヤの分類再編と病原性因子について
3. 学会等名 日本実験動物医学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishikawa H, Sasaki H, Ino S, Kohda C, Tanaka K
2. 発表標題 Influenza virus infection causes reduced G-CSF production in lung followed by neutrophil dysfunction against secondary bacteria infection.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishikawa H, Sasaki H, Ino S, Kohda C, Tanaka K
2. 発表標題 Neutrophil dysfunction in lung during influenza virus infection.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sasaki H, Ishikawa H, Ueshiba H, Kawamoto E, Ike F.
2. 発表標題 Identification of a virulence that is conserved in the biotypes of [Pasteurella] pneumotropica.
3. 学会等名 第90回日本細菌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sasaki H, Ishikawa H, Ueshiba H, Kawamoto E, Ike F.
2. 発表標題 Identification of a virulence that is conserved in the biotypes of [Pasteurella] pneumotropica.
3. 学会等名 第90回日本細菌学会総会
4. 発表年 2017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	池 郁生 (Ike Fumio) (40183157)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・特別嘱託研究員 (82401)	
研究分担者	久保原 禪 (Kubohara Yuzuru) (00221937)	順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・教授 (32620)	