

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500497

研究課題名(和文) 肺パスツレラの病原因子の同定とそれらが宿主の免疫応答に及ぼす影響

研究課題名(英文) Identification of virulence associations and host response in *Pasteurella pneumotropica*.

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： *Pasteurella pneumotropica* (肺パスツレラ)は、げっ歯類の日見感染菌であり、実験動物において感染を防ぐ必要のある病原体の一つである。本研究では、肺パスツレラの病原因子を同定し、宿主細胞の応答性を明らかにすることを目的とした。

今回明らかになった病原因子は、IbpAやYadAなどであった。その中でもIbpAはマクロファージ内に侵入するとリン酸化を受けることが観察され、Srcファミリーキナーゼが関与していることが示唆された。また、YadA陽性株は線維芽細胞や細胞外マトリックスに高い接着性を示した。これらの病原因子が肺パスツレラの共通した病原因子であると考えられた。

研究成果の概要(英文)： *Pasteurella pneumotropica* is an opportunistic pathogen for rodents and is one of preventive pathogens for managing health of laboratory animals. The objectives of this study were to identify virulence associations and to clarify relationships between *P. pneumotropica* pathogenesis and host cell response. In this study, additional RTX toxin, IbpA and YadA were identified in *P. pneumotropica*. Of these, IbpA is involved in tyrosine-phosphorylation in murine macrophage cells by the Src family kinase. YadA is indispensable for adherent against host fibroblast cells and extracellular matrix. These virulence associations are required for *P. pneumotropica* pathogenesis.

研究分野：微生物学、実験動物学、細菌学、応用微生物学

キーワード：肺パスツレラ リン酸化 ドラフトゲノム

1. 研究開始当初の背景

Pasteurella pneumotropica (以下、肺パスツレラ)は、グラム陰性の短桿菌であり、パスツレラ症の病原体である。病原性や病原因子についてはいまだ不明なことが多く、十分にわかっていない菌種である。当菌は、実験動物の微生物モニタリングにおいて高頻度で分離される病原体である。肺パスツレラは伝播性が高く、一度当菌が検出されると施設内汚染が疑われ、動物実験に多大な影響を及ぼすことでも問題となっている。

肺パスツレラの感染は免疫不全の個体では様々な症状を示すが、免疫系が正常な個体に感染した場合は、多くが不顕性感染である。そのため、免疫不全動物とは異なり、正常動物における肺パスツレラ感染はあまり問題視されない場合が多い。しかしながら、最近の報告では、持続感染が続いている免疫系が正常な近交系マウスにおいて、炎症性サイトカインの遺伝子発現量が上昇することが観察されている。このことは免疫系に異常が無い正常なマウスにおいて、症状が顕性化されない場合でも、肺パスツレラ感染が免疫系に影響を及ぼしていることを示す。さらに、我々は当該研究の予備的な試験で、肺パスツレラを培養した培養液から菌体やその残渣を取り除いた無細胞培養液を、免疫系が正常な近交系マウスに腹腔内投与したとき、急激な体重減少が起こることを観察している。これらのことは、免疫系が正常なマウスでも肺パスツレラ感染によって種々の免疫応答や生理的反応が引き起こされていると考えられる。

これらのことから、肺パスツレラの菌体側が持つ病原因子の特定や、宿主の細胞レベルでの応答性や宿主病態に関する知見の集積が望まれている。とくに肺パスツレラは菌株によって生化学性状や遺伝的多様性が高いことから、肺パスツレラの野生株において普遍的な病原因子と宿主応答の情報が必要だと考えられる。

2. 研究の目的

肺パスツレラは、げっ歯類に感染性を示す日和見感染菌であり、実験用げっ歯類の管理上、感染を防ぐ必要のある病原体の一つである。

微生物モニタリング時の肺パスツレラの同定については、生化学性状や遺伝子検査を基にした複数の同定法が報告されている。しかしながら、野生株の一部には既知の肺パスツレラのパターンに無いような複雑な生化学性状を示す株が存在したり、遺伝子検査では、少数しか登録されていない遺伝子バンクのデータと比較したりしなければならず、確定的に同定するための判断材料が少ない状況にある。さらに、これらの方法で同定された肺パスツレラ野生株のすべてがげっ歯類に対して病原性を持つかは不明である。このことから、肺パスツレラの病原因子を明確に

し、その病原因子を判断材料とした同定方法の開発が望まれる。

近年、肺パスツレラから RTX (Repeat in structural toxin)toxin という細胞障害性を示す外毒素数種が同定された。この RTX toxin は、グラム陰性菌が保有する外毒素の一つで、高濃度時には孔を形成し非特異的に細胞を破壊していくが、低濃度時には免疫細胞にインテグリン (LFA-1) を介してアポトーシスを誘導したり、細胞骨格のアクチンを脱重合したりすることが知られている。

肺パスツレラがこの RTX toxin family のタンパク質を産生することが明らかになってきているが、肺パスツレラから同定された 3 種の RTX toxin とも一次構造の違いから作用が異なると予想され、病原性と関連した詳細な機能は明らかになっていない。また、当該試験の予備的な試験において、肺パスツレラのゲノムにはトランスポゾーゼをコードする遺伝子を上流として Pathogenicity island (PAI) が存在する可能性があることが分かってきている。RTX toxin の他にも多くの病原因子をコードする遺伝子群が PAI 上に存在するものと考えられる。

本研究では、既知の病原因子のユニークな機能解析や、肺パスツレラのさらなる病原因子を同定し、その作用機序を明らかにすること、さらに宿主動物の細胞がこれらの病原因子に晒されたときにどのような応答性を行うかをモニタリングし、宿主応答性や病態の違いを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PnxIII A の作用機序解析

肺パスツレラが産生する RTX toxin のうち、PnxIII A はもっとも高分子で、RTX motif の繰り返し配列が 1 回のみというユニークな構造をとっている。その代わり、接着性を担うと考えられる因子が数多く含まれる。今回は、PnxIII A の細胞障害性を担う配列を除去し、接着性や免疫原性を持つ部分だけに改変した MP3 タンパク質を作製し、in vivo における接着性や、免疫原性の効果があるかを検討した。

(2) IbpA の同定と解析

肺パスツレラが産生する血球凝集素のうち、様々なドメインを含む高分子タンパク質 IbpA をコードする遺伝子をゲノムウォーク法とインバース PCR により同定した。さらに、後述するドラフトゲノム解析の結果と比較し、塩基配列の修正を行った。

この IbpA タンパク質のドメインとモチーフ解析を行った。IbpA を組換えタンパク質として大腸菌で作製し、マウスマクロファージ細胞に感染させたときの細胞応答性を観察した。

(3) 肺パスツレラ生物型 Jawetz と Heyl のドラフトゲノム解析

病原因子解析の一環として肺パスツレラの代表株でもある type strain *P. pneumotropica* ATCC 35149 biotype Jawetz ならびに reference strain ATCC 12555 biotype Heyl を用い、ドラフトゲノム解析を行った。さらに、両生物型の株の比較ゲノム解析を行い、共通性の高い病原因子を同定した。

(4)YadA 陽性株と陰性株の比較解析

二つの生物型で共通性の高い病原因子として同定された YadA の陽性株ならびに陰性株について、YadA の性質でもある自己凝集性、コラーゲンに対する接着性、マウス線維芽細胞を用いた生細胞に対する接着性について野生株と標準株を用いて検討した。

4. 研究成果

(1)PnxIII A の作用機序

インタクトの状態の PnxIII A は細胞外マトリックスに対する接着性が高く、とくに 1 型コラーゲンに対して低濃度でも高い接着性を示した。この接着性は、N 末端側に集中する数十アミノ酸残基の繰り返し配列を削除すると低下することから、細胞外マトリックスへの接着にはこれらの繰り返し配列が必要であると考えられた。さらに、この繰り返し配列だけを残し、ほかの細胞障害性を担うと考えられる領域を削除したところ、1 型コラーゲンに対する接着性は保持されていた。この改変した PnxIII A (MP3)タンパク質を用い、マウスに経鼻接種したところ、経鼻接種 3 時間後まで、マウス鼻腔内に滞留することが蛍光観察により確認された。さらに、経鼻接種 1 週間後に肺胞洗浄液中と血中の特異的 IgG ならびに IgA の抗体価を調べたところ、3 回接種したものは高いレベルで MP3 特異的抗体価が上昇していた。これらの抗体価が高い状態で、元株である肺パスツレラを経鼻感染したとき、感染 1 週間後にはほぼすべての器官で肺パスツレラが陰性であることがわかった。

これらのことから、PnxIII A は鼻腔内において高い接着性を示し、宿主には強力な免疫原性を持つタンパク質であると考えられた。

また、本研究の趣旨から外れるものの、この MP3 タンパク質はアジュバンド効果も持っていると考えられ、とくに分泌型 IgA を誘導するときにワクチン抗原の輸送担体としても有効であることが示唆された。

(2)IbpA タンパク質の同定と解析

肺パスツレラの病原因子を特定するため、菌体外に分泌される高分子タンパク質に標的を絞って解析した。その中でも約 470-kDa もの巨大タンパク質の解析を行った。このタンパク質は N 末端部を *Histophilus somni* の IbpA や *P. multocida* が産生する赤血球凝集素 PfhaB などと相同性がみられた。*H. somni* の IbpA と N 末端部の相同性が高いため、*H. somni* の IbpA の特徴でもあるイムノグロブリン

(Ig)との結合性の有無を特異的抗体を作製し試験した。ELISA および免疫沈降 (IP) を行った後のウエスタンブロット (WB)でのマウス IgG との結合性を試験した結果、マウス IgG と結合することが観察された。そのためこのタンパク質を肺パスツレラ IbpA (Immunoglobulin-binding protein A)と命名しコードする遺伝子配列を GenBank に登録した (ibpA: accession no. AB919058, ibpB: AB919059)。

また、C 末端部には、近年特定された AMPylation に関わる Fic (filamentation induced by cAMP)ドメインが確認された。しかしながら、この実験的確認はいまだ確認出来ておらず今後の肺パスツレラ IbpA 解析の課題である。

この Fic ドメインに近い領域には、数十アミノ酸残基の繰り返し配列から構成されている箇所が存在する。これらの中には *Helicobacter pylori* の CagA に見られる EPIYA-motif に類似した配列が複数存在することが観察された。この配列は感染宿主細胞のリン酸化キナーゼによりチロシン残基 (Y) がリン酸化されることが解明されており、*H. pylori* の重要な病原因子であると考えられている。そのため、肺パスツレラ IbpA のチロシン残基がリン酸化されるかマウスマクロファージ細胞を用い IP-WB で試験したところ、マウスマクロファージに肺パスツレラを感染して 2 時間以上経過してからリン酸化されることが観察された。このリン酸化は、時間の経過に依存しており、肺パスツレラの菌数を増やすとリン酸化のシグナル強度も増加することが観察された。リン酸化前では、マウスマクロファージ細胞の形態には異常が見られないが、リン酸化が確認されるとハチドリのかばし様の形態に変化した。さらにこのときに、Src ファミリーキナーゼの強力な阻害剤である PP2 で予め細胞を処理しておく、細胞形態の変化とリン酸化が起こらないことがわかった。これらのことから IbpA のリン酸化には Src キナーゼが関与し、リン酸化された IbpA は細胞内のシグナル伝達を攪乱している可能性があることが示唆された。今後も、IbpA のリン酸化と AMPylation については、細胞生物学的手法で解明していく予定である。

(3)肺パスツレラ生物型 Jawetz と Heyl のドラフトゲノム解析

ドラフトゲノム解析は、Pacific Bioscience 社の PacBio RSII を用い、菌株は生物型 Jawetz としてタイプストレインでもある ATCC 35149 (NCTC 8141)、生物型 Heyl として ATCC 12555 について行った。約一兆塩基のゲノム断片を解析していき、両株ともゲノムサイズのおよそ 200 倍量の塩基配列を解析した。肺パスツレラゲノムのほぼ全域の配列を決定し、難題であった繰り返し配列も読み取ることができたと考えられる。詳細な遺伝子配列

については、生物型 Jawetz の ATCC 35149 については GenBank に BBIX01000001 から BBIX01000009 の番号として登録した。生物型 Heyl の ATCC 12555 については、BBXJ01000001 と BBXJ01000002 の 2 つの contig を登録した。

ドラフトゲノム解析で明らかになった病原性因子の一つは、生物型 Jawetz には RTX toxin をコードする遺伝子が計 4 種存在した。当該研究者がこれまで同定した 3 種の RTX toxin 以外にもう一種 RTX motif が存在する遺伝子産物が存在することが明らかになった。このほか、数種の溶血素をコードする遺伝子の存在がわかったが、遺伝子産物の予測結果からは、強い溶血性ではなく 溶血に近い作用か、若しくはほかの機能を有しているものと予想された。

生物型 Heyl のドラフトゲノム解析で明らかになった病原因子は、Jawetz 型と同じく RTX toxin や数種の溶血素と血球凝集素をコードする遺伝子群が同定された。その中でも YadA (*Yersinia adhesin A*)ドメインを含む高分子タンパク質をコードする遺伝子が両生物型に共通して 4 種類も存在することが新たにわかった。YadA はこれまでの研究から三量体を形成し、細胞や細胞外マトリックスに対する接着性を有していることがわかっている。RTX toxin や IbpA と同じように、肺パスツレラの両生物型に共通する重要な病原因子であると推察された。

(4)YadA 陽性株と陰性株の比較解析

両生物型から同定された YadA をコードしている遺伝子配列をもとに、野生株の分布状況を調べたところ、マウス由来株の 6 割以上が YadA をコードする遺伝子を持っており、ラット由来株にはほとんど存在しないことがわかった。このことから由来動物種の差が有意に認められた ($P < 0.05$)。

YadA 陽性株と陰性株の性状を比較した結果、YadA 陽性株は、自己凝集反応、マウス 4 型コラーゲンに対する接着性、マウス線維芽細胞への接着能がいずれも高いことがわかった ($P < 0.01$)。これらのことから YadA は肺パスツレラ感染に必要な接着因子を担っている病原因子であると結論した。

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 7 件)

1. 佐々木啓・川本英一. 2015. 細菌の病原性解析：肺パスツレラの全ゲノム配列から見てきた病原性. LABIO 21 59: 11-14. 査読無し
2. Sasaki H, Ishikawa H, Asano R, Ueshiba H, Matsumoto T, Boot R, Kawamoto E. 2014.

Draft genome sequence of the rodent opportunistic pathogen *Pasteurella pneumotropica* ATCC 35149^T. Genome Announcements 2(4):e00771-14.

査読有り

3. Sasaki H, Ishikawa H, Kojima K, Itoh M, Matsumoto T, Itoh T, Hosomi O, Kawamoto E. 2013. Intranasal immunization with a non-adjuvanted adhesive protein descended from *Pasteurella pneumotropica* and its preventive efficacy against opportunistic infection in mice. Vaccine 31:5729-5735. 査読有り
4. Ishikawa H, Awano N, Fukui T, Sasaki H, Kyuwa S. 2013. The protective effects of lactoferrin against murine norovirus infection through inhibition of both viral attachment and replication. Biochemical and Biophysical Research Communication 434(4):791-6. 査読有り
5. Ishikawa H, Sasaki H, Fukui T, Fujita K, Kutsukake E, Matsumoto T. 2012. NK cells activated by the induction of asthma play an important role in protecting mice from influenza virus infection. Journal of Clinical Immunology 32:256-267. 査読有り

[学会発表](計 11 件)

1. 佐々木啓 マウスの肺パスツレラ感染症と全ゲノム配列から見てきた病原性 2016 (3 月大阪、大阪国際会議場) 第 89 回日本細菌学会総会ワークショップ「実験動物マウスの細菌感染症」
2. Sasaki H, Ishikawa H, Asano R, Ueshiba H, Matsumoto T, Kawamoto E. Draft genome sequence of the rodent opportunistic pathogen *Pasteurella pneumotropica* ATCC 35149^T. 2015 (3 月岐阜、岐阜国際会議場)

第 88 回日本細菌学会総会

3. Sasaki H, Ishikawa H, Ueshiba H, Kojima K, Itoh T, Hosomi O, Matsumoto T, Kawamoto E. *Pasteurella pneumotropica* IbpA protein is tyrosine-phosphorylated in macrophage cells. 2014(3 月東京、船堀タワーホール) 第 87 回日本細菌学会総会
4. Sasaki H, Ishikawa H, Kojima K, Itoh M, Matsumoto T, Itoh T, Hosomi O, Kawamoto E. Intranasal immunization with a non-adjuvanted adhesive protein descended from *Pasteurella pneumotropica* and its preventive efficacy against opportunistic infection in mice. 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology (XII-JKISM) 2014(3 月東京、船堀タワーホール)
5. 佐々木啓、石川裕樹、児島憲、松本哲哉、伊藤正裕、川本英一. 改変 PnxIII A タンパク質の経鼻接種による肺パスツレラの感染防御効果 2013(3 月東京、東京大学駒場キャンパス) 第 155 回日本獣医学学会学術集会

6 . 研究組織

(1)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

(3)連携研究者

川本 英一 (KAWAMOTO, Eiichi)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20074718

石川 裕樹 (ISHIKAWA, Hiroki)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：60433918