

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293096

研究課題名(和文)百日咳における咳嗽発作の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analyses for the mechanism by which *Bordetella pertussis* causes paroxysmal coughing

研究代表者

堀口 安彦 (Yasuhiko, Horiguchi)

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) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳で見られる特徴的な咳嗽発作の原因となる病原因子の探索のため、咳嗽発作を再現する実験動物モデルを作製し、百日咳類縁菌の気管支敗血症菌を用いて咳嗽発作の病原因子の同定と発症メカニズムの解析を試みた。その結果、気管支敗血症菌の転写制御因子 cx (仮称) が宿主動物の咳発症に関与することがわかった。さらに cx の下流にある咳誘発に直接関与する因子の探索を行ったところ、ポリシストロニックな領域を含めた47箇所の遺伝子領域を候補として挙げることができ、そのうち cxxb と cxxc (いずれも仮称) 遺伝子存在するオペロンが咳誘発に深く関わっていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify a causative factor of *Bordetella pertussis* that causes paroxysmal coughing in the human infection, whooping cough. For this purpose, we established an animal experimental model that replicates coughing similar to that observed in whooping cough by using *B. bronchiseptica*, which is closely related to *B. pertussis*. As a result, we found that a transcriptional regulator (tentatively named cx) is involved in induction of coughing in animals infected with *B. bronchiseptica*. Furthermore, by seeking the genes, of which expression is regulated by cx, we found 47 loci that reside downstream of cx, and of the 47 loci, an operon including tentatively-named cxxb and cxxc genes were found to be responsible for the cough production.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳

1. 研究開始当初の背景

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の上部気道感染によって起こる伝染性の疾病である。患者は本症で特徴的な発作性の咳嗽により無呼吸状態に陥るため、チアノーゼや痙攣さらには脳症を起こし、重篤な場合は死に至る。WHOによると、本疾患により毎年世界で約20万人-30万人が死亡している。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に接種したワクチン効果の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。百日咳は古くから知られた病気であるが、その感染成立機構はほとんどわかっていない。現行のワクチンは一定の予防効果を期待できるが、感染成立機構が不明なために、ワクチン成分(百日咳毒素や繊維状赤血球凝集素)が主要防御抗原として有効な理由も不明である。この事実は抗原変異株の蔓延が憂慮されている将来に、大きな不安材料を与えている。また、百日咳で見られる発作性咳嗽は患者に多大な負荷を強い、ときに死因に直結するが、その発症機構も不明である。そのため、臨床現場では発作性咳嗽には対症療法を持って処置せざるを得ないのが現状である。

百日咳の感染・発症機構の解析が進まない理由に、百日咳菌がヒトに特化した病原細菌であるために、感染動物モデルを確立し難いという問題が挙げられる。そこで、百日咳菌感染のモデル菌として、哺乳動物に広範な宿主域を持つ近縁種の気管支敗血症菌 (*B. bronchiseptica*) がよく利用されている。百日咳菌と気管支敗血症菌は相同性の高い一連の病原因子の遺伝子を共通して保有しており、両菌ともそれぞれの宿主に経気道的に感染し、咳嗽発作を引き起こす。これまで報告されてきた百日咳関連の感染動物モデルにはマウスが用いられてきているが、いずれも投与菌数がきわめて多いことや感染が短期間で終息すること、また咳嗽などの症状の発現に乏しいことなどから、病状を正確に再現するモデルとは言い難かった。一方、申請者らは気管支敗血症菌と種々の動物の組み合わせで、改めて本菌の感染実験スクリーニングを行い、少ない投与菌数で一定期間の感染が成立しかつ咳嗽を再現する、という条件を満たす感染動物モデルを作製することに成功した。さらにその研究過程で、感染は成立するが宿主の咳嗽発作を起こさない自発性変異株 (A株) を分離することができた。

そこで、平成23-25年度に科学研究費補助金基盤研究(B)の交付を受けて研究を進展させ、野生株とA株の全ゲノム配列を解析した結果、A株のcx(Cough X, 仮称) 遺伝子には1塩基の欠失のあることがわかった。野生株のcx 遺伝子を人為的に欠損させると、野生株の咳嗽惹起能は著しく低下し、一方A株に野生型 cx 遺伝子を相補すると、菌の咳発作

惹起能は回復した。cx 遺伝子は、感染宿主に咳を惹起するボルデテラ属細菌である百日咳菌、パラ百日咳菌、気管支敗血症菌全てのゲノムにおいて高度に保存されている。これらのことは、cx 遺伝子が百日咳症における咳発作の発症に関与していることを示している。また、cx 遺伝子を欠失させた気管支敗血症菌では、複数の病原因子の発現レベルに著しい変動が見られた。すなわち、cx 遺伝子産物であるCXは複数の既知の病原遺伝子の転写制御に関わっていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、CXの機能を解析することにより、発作性咳嗽の直接の原因となる細菌側病原因子の同定と、咳嗽発作の発症メカニズムの解明を目指した。百日咳は百日咳菌の上部気道感染によって起こるヒトの呼吸器感染症である。発作性咳嗽は無呼吸状態から痙攣さらには脳症を起こして罹患者を死に至らしめる、本症重篤化の原因症状である。本研究の成果をもって申請者は、咳嗽の原因療法の開発を通じて百日咳患者の負荷を軽減し本症の死亡率を低下させることに貢献できると考えた。

3. 研究の方法

本研究では、CXが直接に咳嗽発作に関与している場合と、CXによって転写制御を受けるCXXが咳嗽発作に関与している場合の二つの可能性について検証し、咳嗽発作の原因因子の同定を目指した。前者の検討においてはCXの組換えタンパク質をラットに鼻腔内投与して咳嗽発作の有無を検討し、後者の場合はCXによって転写制御を受ける遺伝子を網羅的に解析し、その中からcxc 遺伝子のスクリーニングを目指した。

1) CXが直接に咳嗽発作に関与するかどうかの検討：大腸菌発現系を用いてCX組換えタンパク質(rCX)を作製した。さらにrCXを適当な濃度域でラット鼻腔内投与し、ラットの咳嗽発作を観察した。

2) CXの下流で転写制御を受け、咳嗽発作の原因となるCXXの同定(上記実験でCXが咳嗽の直接原因でないと判断された場合)：CXの咳嗽発作への直接関与が否定された場合、本実験でCXによって転写制御を受ける咳嗽因子(CXX)を探索する。CX遺伝子が他の遺伝子の転写を制御することから、気管支敗血症菌の野生型株で発現が高く、CX遺伝子欠失株で発現の低い遺伝子cxcを、マイクロアレイ、iTRAQなどの網羅的解析で野生株とCX変異株での遺伝子・タンパク発現の差異を精査し、候補となる遺伝子ピックアップしてそれぞれの咳嗽発作への関与を検討した。

4. 研究成果

1) CXが直接に咳嗽発作に関与するかどうかの検討：組換えタンパク質rCXを大腸菌を用いて産生させ、これを実験動物に投与した

が、咳嗽発作は認められなかった。rCX が本来の機能を失っている可能性も考えられたが、後述のように cx 欠損株と野生型株の遺伝子発現パターンが著しく異なっていることが明らかになったため、CX が他の遺伝子の転写制御に関わっていることを重視し、その下流の遺伝子の探索に研究の焦点を移動させた。

2) CX の下流で転写制御を受けて、咳嗽発作の原因となる CXX の同定: 野生株と cx 欠損株との間の遺伝子発現パターンをマイクロアレイで比較検討したところ、cx 欠損株で著しく発現の低下した 40 程度の遺伝子領域を同定した。このうち、塩基配列から推定される機能などに基づいて任意に 24 遺伝子を選び出し、それぞれの遺伝子の欠損変異株の咳嗽惹起能を調べた。

その結果、3 種の遺伝子の欠損株において感染動物の咳嗽発作症状の減弱が認められた。そのうち 1 種の遺伝子欠損株は咳嗽惹起能が他の 2 種に比べて強く残り、別の 1 種は気道への定着能が低下していたため、残り 1 種の遺伝子 (CXXa) についてさらに機能解析を行った。その結果、CXXa 欠損株の感染実験では咳嗽発作が著しく低下するものの、この株の菌破砕液の経鼻投与実験では野生型と同程度の咳嗽発作を示すことがわかった。さらに、CX 欠損株の菌破砕液も同様に咳嗽発作を起こした。このことから、CXXa は直接の咳誘発因子ではないことが示唆された。また CX の下流を探索する方法で、咳誘発因子の同定に至らなかったことから、咳誘発因子同定のための方法論を再考する必要が考えられた。そこで異なる観点を交えて CX の下流にある咳誘発因子の探索を行ったところ、ポリシストロニックな領域を含めた 47 箇所の遺伝子領域を候補として挙げることができ、そのうちの 1 箇所のオペロンを欠損させた際に、生菌および菌体破砕液の経鼻投与での咳誘発能が著しく低下することを見出した。このオペロンには 2 種の遺伝子が存在 (仮に CXXb と CXXc とする) することがわかった。

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 6 件) 全て査読あり

- 1) Okada, K., Ogura, Y., Hayashi, T., Abe, A., Kuwae, A., Horiguchi, Y. and Abe, H. 2014. Complete Genome Sequence of *Bordetella bronchiseptica* S798, an Isolate from a Pig with Atrophic Rhinitis. *Genome Announcements* 2 (3): e00436-14-e00436-14.
- 2) Abe, H., Kamitani, S., Fukui-Miyazaki, A., Shinzawa, N., Nakamura, K. and Horiguchi, Y. 2015. Detection of genes expressed in *Bordetella bronchiseptica* colonizing rat trachea by in vivo expressed-tag immunoprecipitation method. *Microbiology and Immunology* 59 (5): 249-261.

- 3) Ban, E., Yoshida, Y., Wakushima, M., Wajima, T., Hamabata, T., Ichikawa, N., Abe, H., Horiguchi, Y., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E., Yamamoto, T., Wada, T. and Nishikawa, Y. 2015. Characterization of unstable pEntYN10 from enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) O169:H41. *Virulence* 6 (8): 735-744.
- 4) Irikura, D., Monma, C., Suzuki, Y., Nakama, A., Kai, A., Fukui-Miyazaki, A., Horiguchi, Y., Yoshinari, T., Sugita-Konishi, Y. and Kamata, Y. 2015. Identification and Characterization of a New Enterotoxin Produced by *Clostridium perfringens* Isolated from Food Poisoning Outbreaks. *PLoS ONE* 10 (11): e0138183.
- 5) Okada, K., Abe, H., Ike, F., Ogura, Y., Hayashi, T., Fukui-Miyazaki, A., Nakamura, K., Shinzawa, N. and Horiguchi, Y. 2015. Polymorphisms Influencing Expression of Dermonecrotic Toxin in *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS ONE* 10 (2): e0116604.
- 6) Nishikawa, S., Shinzawa, N., Nakamura, K., Ishigaki, K., Abe, H. and Horiguchi, Y. 2016. The bvg-repressed gene *brtA*, encoding biofilm-associated surface adhesin, is expressed during host infection by *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology and Immunology* 60 (2): 93-105.

〔学会発表〕(計 33 件)

- 1) 西川明芳、安倍裕順、岡田圭祐、神谷重樹、福井理、堀口安彦. 気道温度で発現誘導される気管支敗血症菌の新規病原因子候補. 第 8 回細菌学若手コロッセウム; 2014 年 8 月 6 日-8 月 8 日: 北海道ニセコ ホテルニセコいこいの村
- 2) 岡田圭祐、照屋志帆乃、安倍裕順、福井理、堀口安彦. ボルデテラ壊死毒素研究の最近の進捗について. 第 61 回トキシシンポジウム、2014 年 9 月 3 日-9 月 5 日、徳島県鳴門市 ルネッサンスリゾートナルト.
- 3) 岡田圭祐、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 回日本細菌学会関西支部総会、2014 年 11 月 22 日、兵庫県西宮市 兵庫医科大学.
- 4) 西川明芳、新澤直明、安倍裕順、堀口安彦. 気管支敗血症菌が宿主感染時に発現する新規付着因子の解析. 第 67 回日本細菌学会関西支部総会、2014 年 11 月 22 日、兵庫県西宮市 兵庫医科大学.
- 5) Nishikawa, S., N. Shinzawa, H. Abe, A. Fukui, Y. Horiguchi. Biofilm-associated *Bordetella* RTX surface adhesion (*BrtA*) is expressed during animal infection. 第 88 回日本細菌学会総会. 2015 年 3 月 26 日-3 月 28 日、岐阜県 長良川国際会議場.
- 6) Ishigaki, K., N. Shinzawa, Y. Horiguchi. Genetic dissection of host selectivity in the *Bordetella* by interspecies genomic complementation. 第 88 回日本細菌学会総会 2015 年 3 月 26 日-3 月 28 日、岐阜県 長良川国際会議場.
- 7) 照屋志帆乃、中村佳司、福井理、安倍裕順、新澤直明、堀口安彦. ボルデテラ壊死毒

- (DNT)の細胞受容体探索. 第88回日本細菌学会総会 2015年3月26日-3月28日、岐阜県 長良川国際会議場.
- 8) Abe, H., Y. Horiguchi. 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-9月11日. 兵庫県 淡路夢舞台国際会議場
- 9) Nishikawa, S., N. Shinzawa, K. Ishigaki, H. Abe, Y. Horiguchi. Biofilm-associated *Bordetella* RTX surface adhesion (BrtA) is expressed during animal infection. 第14回あわじしま感染症/免疫フォーラム. 2015年9月8日-9月11日. 兵庫県 淡路夢舞台国際会議場
- 10) 西川明芳, 新澤直明, 中村佳司, 石垣佳祐, 安倍裕順, 堀口安彦. 気管支敗血症菌のバイオフィーム関連付着因子 brtA は Bvg 抑制遺伝子でありながら宿主感染時に発現している. 第9回細菌学若手コロッセウム. 2015年11月23日-11月25日, 鹿児島県 KKR ホテル敬天閣.
- 11) 石垣佳祐, 新澤直明, 堀口安彦. ゲノム相補システムによるボルデテラ属菌の宿主特異性決定メカニズム解明. 第68回日本細菌学会関西支部総会 2015年11月8日, 京都府 京都薬科大学.
- 12) 西川明芳, 新澤直明, 中村佳司, 石垣佳祐, 安倍裕順, 堀口安彦. 気管支敗血症菌のバイオフィーム関連付着因子 brtA は Bvg 抑制遺伝子でありながら宿主感染時に発現している. 第68回日本細菌学会関西支部総会. 2015年11月8日, 京都府 京都薬科大学.
- 13) Fukui-Miyazaki, A., H. Toshima, N. Shinzawa, K. Nakamura, H. Abe, Y. Horiguchi. Adenylate cyclase toxin from *B. pertussis* but not *B. bronchiseptica* causes tracheal tissue damage during infection. 第68回日本細菌学会関西支部総会. 2015年11月8日, 京都府 京都薬科大学.
- 14) 堀口安彦. 百日咳菌と気管支敗血症菌が産生するアデニレートサイクラーゼ毒素の構造・機能比較. 第38回日本分子生物学会第88回日本生化学会大会合同大会 2015年12月1日-12月4日, 兵庫県神戸市 神戸ポートピアホテル.
- 15) 福井理, 戸嶋ひろ野, 新澤直明, 中村佳司, 安倍裕順, 堀口安彦. 百日咳菌が産生するアデニレートサイクラーゼ毒素は気道の組織障害を引き起こす. 第89回日本細菌学会総会. 2016年3月23日-3月25日, 大阪府 大阪国際交流センター.
- 16) 中村佳司, 神谷重樹, 安倍裕順, 新澤直明, 堀口安彦. 百日咳の病態発生機序解明に向けた感染動物モデルの確立. 第89回日本細菌学会総会. 2016年3月23日-3月25日, 大阪府 大阪国際交流センター.
- 17) 石垣佳祐, 新澤直明, 堀口安彦. ボルデテラ属菌の宿主特異性決定機構解明に向けたゲノム相補システムの開発. 第89回日本細菌学会総会 2016年3月23日-3月25日, 大阪府 大阪国際交流センター.
- 18) 新居祐規, 中村佳司, 鈴木孝一朗, 安倍裕順, 新澤直明, 堀口安彦. Analysis of roles of pertussis toxin in infection. 第89回日本細菌学会総会. 2016年3月23日-3月25日, 大阪府 大阪国際交流センター.
- 19) 鈴木孝一朗, 新澤直明, 中村佳司, 堀口安彦. Seeking novel antigens against *Bordetella pertussis* infection. 第89回日本細菌学会総会. 2016年3月23日-3月25日, 大阪府 大阪国際交流センター.
- 20) 木島英美, 西川明芳, 石垣佳祐, 堀口安彦, 新澤直明. Genetic dissection of multi-nucleated giant cell formation by *Burkholderia thailandensis* infection. 第89回日本細菌学会総会. 2016年3月23日-3月25日, 大阪府 大阪国際交流センター.
- 21) 新澤直明, 鈴木孝一朗, 元岡大祐, 中村昇太, 堀口安彦. In vivo RNA-seq revealed infection-linked expression pattern of *Bordetella pertussis* within host. 第89回日本細菌学会総会. 2016年3月23日-3月25日, 大阪府 大阪国際交流センター.
- 22) Ishigaki, K., S. Nishikawa, N. Shinzawa, Y. Horiguchi. Development of the novel genomic integration system to study the host tropism of *Bordetella* spp. The 11th International *Bordetella* Symposium. 2016年4月5日-4月8日, プエノスアイレス, アルゼンチン.
- 23) Ishigaki, K., S. Nishikawa, N. Shinzawa, Y. Horiguchi. Development of the novel genomic integration system to study the host tropism of *Bordetella* spp. The 13th Korea-Japan International Symposium on Microbiology. 2016年5月12日-5月13日. 慶州市 韓国.
- 24) 福井理, 戸嶋ひろ野, 新澤直明, 中村佳司, 安倍裕順, 堀口安彦. アデニレートサイクラーゼ毒素 (ACT) の作用がボルデテラ属細菌の感染に及ぼす影響. 第63回トキシシンポジウム. 2016年7月14日-7月16日. 山形県天童市.
- 25) 堀口安彦. 細菌感染症の中での毒素の役割: ボルデテラ属菌を中心に. 第159回日本獣医学会学術集会. 2016年9月6日-9月8日. 神奈川県藤沢市.
- 26) 石垣佳祐, 新澤直明, 西川明芳, 堀口安彦. O抗原合成に関わる長鎖ゲノム領域の相補によるO抗原発現百日咳菌の作製. 第159回日本獣医学会学術集会. 2016年9月6日-9月8日. 神奈川県藤沢市.
- 27) Horiguchi, Y. Adenylate cyclase toxins

from *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*: Different roles in their pathogenesis? International meeting of the federation of Korean Microbiological Societies. 2016年11月3日-11月4日. 仁川市 韓国.

- 28) 新澤直明、木島英美、西川明芳、石垣佳祐、堀口安彦. *Burkholderia* 属 *pseudomallei* group 細菌の細胞内生活環に関わる因子の同定. 第69回日本細菌学会関西支部総会. 2016年11月19日、大阪市 大阪市立大学
- 29) 鈴木孝一郎、新澤直明、石垣佳祐、生田和良、山西弘一、堀口安彦. 再興する百日咳の制御に向けた新規感染防御抗原の探索研究. 第48回日本小児感染症学会. 2016年11月19日-11月20日. 岡山市.
- 30) 鈴木孝一郎、新澤直明、元岡大祐、中村昇太、石垣佳祐、生田和良、山西弘一、堀口安彦. In vivo RNA-seq reveals novel antigens against *Bordetella pertussis* infection. 石垣佳祐、新澤直明、西川明芳、鈴木孝一郎、堀口安彦. Ectopic expression of O-antigen in *Bordetella pertussis* by a novel genomic integration system. 第90回日本細菌学会総会. 2017年3月19日-3月21日、仙台市.
- 31) 岡真優子、木村唯、矢倉大介、新澤直明、堀口安彦、市川寛、南山幸子. 大腸菌の細胞外小胞によるマクロファージのエキソソームを介した炎症反応. 第90回日本細菌学会総会 2017年3月19日-3月21日、仙台市.
- 32) 東麻衣、西川明芳、石垣佳祐、安倍裕順、堀口安彦、新澤直明. *Bordetella* P1rS-mediated virulence regulatory system is important for the respiratory infection. 第90回日本細菌学会総会. 2017年3月19日-3月21日、仙台市.
- 33) 塚本健太郎、新澤直明、堀口安彦、辻孝雄. *Bartonella henselae* に由来する新規血管新生因子の探索第90回日本細菌学会総会. 2017年3月19日-3月21日、仙台市.

〔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 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
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

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
新澤 直明 (SHINZAWA Naoaki)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：10583015

中村 佳司 (NAKAMURA Keiji)
九州大学大学院・医学研究院・学術研究員
研究者番号：60706216

(4) 研究協力者
なし