

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15276

研究課題名(和文) 長鎖DNA断片導入による、汎用実験動物に感染する百日咳菌の作出

研究課題名(英文) Preparation of *Bordetella pertussis* that infects experimental animals by introduction of large DNA fragments from *B. bronchiseptica*

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトのみを自然宿主とする百日咳菌に広い宿主域を持つ気管支敗血症菌の長鎖ゲノム断片を導入することによって、実験動物に感染する組換え百日咳菌を作製することを目的に、当研究課題を実施した。この成果によって得られる百日咳菌は感染動物モデルの作製を通じて、百日咳症発症の解析に寄与すると考えられる。

この目的のために、申請者らはファージの組換え機構と大腸菌人工染色体(BAC)を組み合わせた新規のゲノム組換え系(BBI法を開発した。本法により、50 kb前後の長鎖DNA断片を百日咳菌に導入することに成功したが、実験動物に安定的に感染する百日咳菌を得ることはできなかった。

研究成果の概要(英文)： *Bordetella pertussis* (Bp) is a strictly human-adapted pathogen. The Aim of this study is to generate Bp mutants by introducing large DNA fragments into Bp genomes from *B. bronchiseptica* (Bb), which infects broad range of mammals. If Bp mutants that infect experimental animals were successfully obtained, it should be a powerful tool to dissect the pathogenesis of Bp through animal infection models. To accomplish this purpose, we developed a novel method designated BBI system to enable us to introduce ~50 kb of DNA fragments into genomes of recipient bacteria. Our results revealed that the DNA fragment introduced by BBI system could be functional in the recipient bacteria; however, after screening of more than 1,500 clones of Bp, into which large DNA fragments were introduced from *B. bronchiseptica*, we could not obtain mutant strains of Bp that readily infects rats. We are now conducting further work to obtain Bp mutants which infects small experimental animals.

研究分野：細菌学

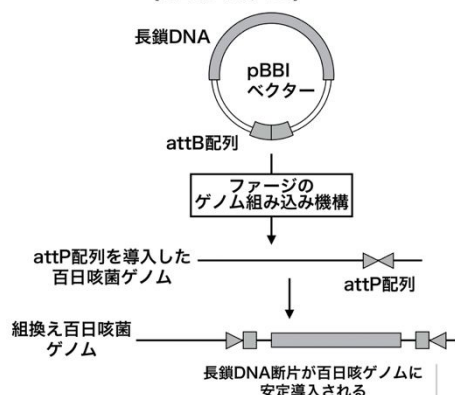
キーワード：百日咳菌 気管支敗血症菌

1. 研究開始当初の背景

百日咳は百日咳菌の上部気道感染によって起こる伝染性の疾病である。患者は特徴的な発作性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。古くから知られた病気であるが、その感染成立メカニズムはほとんどわかっていない。さらに、百日咳で見られる発作性咳嗽の発症メカニズムも不明である。

百日咳菌の自然宿主はヒトに限られるため、百日咳の感染動物モデルの作製は難しい。このことが、百日咳の感染成立機構や病態発生機構の解析の障害となっている。一方、百日咳菌の近縁種である気管支敗血症菌は多くの病原因子を百日咳菌と共有するうえ、百日咳菌とは異なり広い宿主特異性を示し、かつ感染動物に百日咳と同様の咳発作起こすことが知られている。全ゲノム配列の解析結果から、百日咳菌は気管支敗血症菌に近い祖先種から多数の遺伝子の転移と欠失が繰り返されて系統分化してきたと考えられている。またこの過程で百日咳菌が新たに獲得した遺伝子はきわめて少ない。このことから申請者は、気管支敗血症菌の遺伝子を百日咳菌に相補することで、気管支敗血症菌のように広い宿主域を持つ百日咳菌を作製できる可能性を考えた。さらに最近、この相補実験を可能にする、長鎖 DNA を百日咳菌に導入する方法の確立に成功した。この方法の基本原理解は、ファージが認識するアタッチメントサイトの att 配列をプラスミドベクターと百日咳菌ゲノムに導入し、このアタッチメントサイトを介して長鎖 DNA 断片をプラスミドベクターから百日咳菌ゲノムに組換え導入させるというものである。この方法 (BAC-based integration system, BBI 法) により、約 50 kbp までの任意の外来 DNA 断片を安定的に百日咳菌に導入し、遺伝子領域の機能を発現させることができる。BBI 法を利用することによって、系統分化の過程で百日咳菌で失われた遺伝子を気管支敗血症菌遺伝子で相補できれば、その中から気管支敗血症菌のようなヒト以外の哺乳動物に感染する変異株が作製できる可能性を考えた。

図1 申請者らが開発したゲノム組換え系 (BBIシステム)



2. 研究の目的

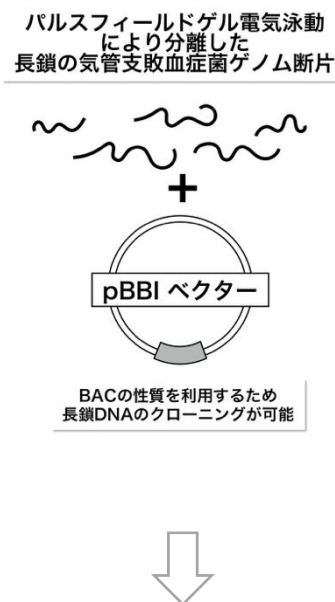
本研究課題では、気管支敗血症菌の長鎖ゲノム断片ライブラリを導入した百日咳菌をラットに経鼻感染させ、定着増殖した菌を回収してラット感染性を相補する遺伝子を同定する。さらに同定した遺伝子を恒常的に百日咳菌で発現させて、ラットに感染できる組換え百日咳菌を作出する。また、その際に同定したラット感染性を相補する遺伝子の機能を解析することにより、宿主特異性を決定する細菌側因子の解析を展開する。その成果により、細菌の宿主特異性の決定メカニズムの一端が理解できるものと期待される。

3. 研究の方法

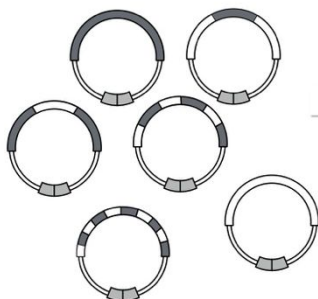
(1) 概要: 感染による発咳が確認されている幼齢ラットの気管支敗血症菌感染モデルを利用して、BBI 法で作製した気管支敗血症菌ゲノム断片を導入した百日咳菌の感染実験を繰り返すことにより、ラットに対する感染性のある百日咳菌の作出を目指した。実験実施に向けて、BBI 法の実用性を検討確認し、さらにラットに感染性のある百日咳菌に導入された気管支敗血症菌の遺伝子の機能解析を試みた。

(2) 百日咳菌の気管支敗血症菌ゲノム相補ライブラリーの作製: 制限酵素処理およびパルスフィールドゲル電気泳動で調製した気管支敗血症菌の長鎖ゲノム断片を BBI 法で百日咳菌に導入し、気管支敗血症菌ゲノム相補ライブラリーを作製した。

図2 ライブラリー作製の概念図



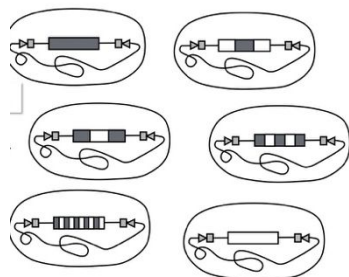
気管支敗血症菌ゲノムライブラリー



様々な長さの長鎖ゲノム断片が組み込まれている



組換え百日咳菌ライブラリー



それぞれ異なったゲノム断片が百日咳菌ゲノムに導入されている

(3) 気管支敗血症菌ゲノム相補ライブラリーを用いたラット感染スクリーニング：気管支敗血症菌ゲノム相補ライブラリーをラットに経鼻感染させ、感染9日目以降のラットの気管あるいは肺から菌を回収した。

(4) ラット感染が成立した組み換え百日咳菌に導入された遺伝子の同定：上記で回収した組み換え百日咳菌に導入された気管支敗血症菌ゲノム断片をインバース PCR 法によって同定した。

4. 研究成果

(1) BBI 法の実効性の確認：BBI 法の実効性を担保するため、本法を用いて、LPS に 0 抗原のない百日咳菌に気管支敗血症菌の 0 抗原合成遺伝子領域 (*wbm* 領域：約 32 kb) を導入し、その性状を検討した。*wbm* 領域を導入された百日咳菌は、気管支敗血症菌と同等の 0 抗原を安定的に発現することを確認した。このことにより、BBI 法によって機能的な遺伝

子領域を百日咳菌に導入することが十分可能であることが示された。

(2) BBI 法を用いた気管支敗血症菌ゲノム相補ライブラリー (BbBAC/Bp ライブラリー) の作製：BBI 法を用いて、589 クローンからなる BbBAC/Bp ライブラリーを作製した。ライブラリーに導入された気管支敗血症菌ゲノム DNA 断片の平均長は 30 kb 程度であった。ここから、 $589 \times 30 \text{ kb} = 17670 \text{ kb}$ と概算して、5.3 Mb の気管支敗血症菌ゲノムを約三倍の冗長性でカバーしていると考え、予備実験としてこのライブラリーをラットに経鼻感染させた。感染 16 日後にラット鼻腔から菌を回収して再度感染実験に供し、感染 23 日後に再び菌を回収した。このサンプルからゲノムを回収し、挿入 DNA 断片塩基配列を決定したところ、挿入断片には鉄輸送関連遺伝子 *x* が高い頻度で回収されていることがわかった。しかし、クローン化した遺伝子 *x* のみを導入した百日咳菌のラット感染・定着能は野生型親株のそれと変わらなかった。

そこで次に、平均長 15 kbp の気管支敗血症菌ゲノム断片を持つ 6641 クローンを分離して実験に供した。このライブラリーは気管支敗血症菌ゲノムを約 20 倍の冗長性でカバーする。このライブラリーの断片を BBI 法で百日咳菌に導入して回収できた百日咳菌 932 クローンをラットに感染させたが、野生型百日咳菌と比較して有意に定着の安定したクローンを得ることはできなかった。一方、前年度に BBI 法を用いて作製した 0 抗原のある LPS を発現する百日咳菌の血清抵抗性を検討したところ、野生型に比べて血清抵抗性が向上していることがわかった。

以上の結果から、本研究で開発した BBI 法は任意の長鎖遺伝子を受容菌に導入する目的には有用であることはわかったが、本研究課題の目標であったランダムにゲノム断片を導入して百日咳菌の宿主特異性を変更させるまでには至らなかった。BBI 法では長鎖 DNA といえどもゲノム上で連続した遺伝子領域しか受容菌に導入することができないため、百日咳菌にラット感染性を付与する遺伝子が気管支敗血症菌のゲノム上の離れた領域に分布している場合などでは、関連遺伝子を回収できない可能性が充分あることから、今後は BBI 法のこの欠点をカバーする方法を開発する必要があると考えられた。

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)

Ishigaki, K., N. Shinzawa, S. Nishikawa, K. Suzuki, A. Fukui-Miyazaki, Y. Horiguchi, Ectopic Expression of 0 Antigen in *Bordetella pertussis* by a Novel Genomic Integration System, *mSphere.*, 3(1):e00417-17, 2018, doi : 10.1128/

mSphere.00417-17, 査読有
Suzuki.K,N.Shinzawa,K.Ishigaki,K.Nakamura,H.Abe,A.Fukui-Miyazaki,K.Ikuta,Y.Horiguchi,Protective effects of in vivo-expressed autotransporters against *Bordetella pertussis* infection.,MicrobiolImmunol.,Sep;61(9):371-379.,2017,doi:10.1111/1348-0421.12504,査読有

〔学会発表〕(計5件)

KeisukeIshigaki, Naoaki Shinzawa, Sayaka Nishikawa, Koishiro Suzuki, Yasuhiko Horiguchi,Ectopic Expression of O Antigen in *Bordetella pertussis* by a Novel Genomic Integration System,The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity,2017,淡路市(兵庫県)

石垣佳祐、新澤直明、西川明芳、鈴木孝一朗、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,仙台市(宮城県)

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成,第159回日本獣医学会学術集会,2016,藤沢市(神奈川県)

Keisuke Ishigaki, Naoaki Shinzawa, Sayaka Nishikawa, Yasuhiko 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,慶州市(韓国)
Keisuke Ishigaki, Sayaka Nishikawa, Naoaki Shinzawa, Yasuhiko Horiguchi, Development of the novel genomic integration system to study the host tropism of *Bordetella* spp.,11th International *Bordetella* Symposium,2016,ブエノスアイレス(アルゼンチン)

〔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

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)
東京医科歯科大学・大学院医学科・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・研究員
研究者番号：60706216

(4) 研究協力者

なし