

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19446

研究課題名(和文)キメラ細菌の作製による病原細菌の宿主特異性決定機構の解析

研究課題名(英文)Construction of chimeric bacteria and analysis of host specificity determination mechanism of pathogenic bacteria

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：病原性細菌の宿主特異性の決定機構を遺伝子レベルで解析することを目的として、ヒトにのみ感染する百日咳菌と広範な哺乳動物種を宿主とする気管支敗血症菌を融合させて、ヒト以外の実験動物に感染するキメラ細菌の作製を試みた。その結果、供試菌数の約0.01%の割合で融合菌候補株を単離することができ、さらにその1割程度の割合で、ゲノム交雑の可能性を示す菌株が得られた。しかし予想よりも短いゲノム領域で組み換えが生じていることや、親株の気管支敗血症菌に自発的にゲノム構造に逆位が生じた変異株が発生することなどの問題が生じ、残念ながら当初の目的を達成することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の融合技術は40年以上前に隆盛し、微生物では品種改良の目的で乳酸菌、糸状菌、酵母などで利用されたが、特定の遺伝子を標的にできる、より精細な遺伝子操作技術が発展した現在ではほとんど利用されない。異なる種の真正細菌の細胞融合に関する研究はさらに少なく、種々の方法論が確立される前に研究が衰退してしまったため、現在の科学の動向や水準からみて参考となる知見はほとんどない。本研究課題では所期の目的は達成できなかったが、細胞融合の基準プロトコールと融合候補細菌の遺伝子解析の結果を示すことができた。その成果は、キメラ細菌の作製技術の再理解のための最新の知見を提供すると考えている。

研究成果の概要(英文)：To analyze the mechanism of determining host specificity of pathogenic bacteria at the genetic level, we attempted to generate chimeric bacteria that infect non-human laboratory animals by fusing *B. parapertussis*, which infects only humans, and *B. bronchiseptica*, which infects a wide range of mammalian species. As a result, we isolated candidate strains for fused bacterial cells at a rate of about 0.01% of the number of bacteria tested. Of these strains, about 10% showed the potential for genomic hybridization. Unfortunately, however, we were unable to achieve our initial goal due to problems such as recombination occurring in a shorter genomic region than expected and the occurrence of mutant strains with spontaneous inversion of the genomic structure in parental *B. bronchiseptica*.

研究分野：細菌学

キーワード：細胞融合 キメラ細菌

1. 研究開始当初の背景

パラ百日咳菌と気管支敗血症菌は、ヒトの百日咳症の原因菌である百日咳菌と同じボルデテラ属に分類される呼吸器感染性の病原細菌である。これら三菌種は多くの病原因子を共有するが、百日咳菌はヒトにのみ感染し、パラ百日咳菌にはヒツジかヒトに感染するそれぞれ二系統が存在し、気管支敗血症菌は広範な哺乳動物に感染するという、明確に異なる宿主特異性を示す。

各菌種のゲノムサイズは、気管支敗血症菌が最も大きく、続いてパラ百日咳菌、百日咳菌の順に小さくなっている。ゲノムサイズの大きい気管支敗血症菌には可動遺伝子の挿入配列 (IS) のゲノム内挿入がほとんど認められないのに対して、ゲノムサイズの小さくなるパラ百日咳菌、百日咳菌の順でゲノム内の IS 数が増加している。三菌種で保存されているそれぞれの遺伝子相同性はきわめて高く、ゲノムサイズの小さいパラ百日咳菌や百日咳菌に特有の遺伝子領域はほとんど存在しない。以上の知見から、これらのボルデテラ三菌種は、気管支敗血症菌の類縁の祖先菌から IS の挿入欠失に伴う多数の遺伝子の転移と欠失が繰り返されて、大規模な遺伝子獲得のないままパラ百日咳菌と百日咳菌が系統分化してきたと結論されている。このように、共有遺伝子の保存性が高く、基本的に遺伝子の失活や欠失によって系統分化し、かつそれぞれの宿主特異性が異なるボルデテラ三菌種は、細菌の宿主特異性の決定機構をゲノム中の遺伝子配列の差や存否から解析する目的に格好の細菌であると考えられる。

2. 研究の目的

上述のような背景から、本課題では、ボルデテラ細菌を利用して病原性細菌の宿主特異性の決定機構を遺伝子レベルで解析することを目的に研究を計画した。その基本戦略は、ゲノムサイズが大きく広範な宿主特異性を持つ気管支敗血症菌の遺伝子を、ヒトにのみ感染する百日咳菌やパラ百日咳菌に相補して、ヒト以外の実験動物に感染する変異体を分離し、その責任遺伝子 (領域) を同定するというものである。この際の気管支敗血症菌のカウンターパートとして、パラ百日咳菌を選択した。パラ百日咳菌と百日咳菌はどちらも気管支敗血症菌類縁菌から遺伝子欠失によって系統分化してきたと考えられることは既に述べたが、両者のゲノム構造に明確な違いがある (右図)。百日咳菌ゲノムにはきわめて多数の IS が挿入された結果、遺伝子が大規模に転移しているために気管支敗血症菌と全く異なるゲノムの配列構造を取っている。これに対し、パラ百日咳菌では IS 挿入が少なく、そのゲノム構造は気管支敗血症菌にかなり近い。このことから、気管支敗血症菌とパラ百日咳菌のあいだでは遺伝子の発現制御機構がよく保存され、また予測困難な遺伝子の機能・構造変化が少ないことが予想される。

以前の研究課題 (平成 28-29 年度、挑戦的萌芽研究 16K15276) において、研究代表者らは気管支敗血症菌の長鎖 DNA 断片をパラ百日咳菌や百日咳菌に導入し、動物に感染する百日咳菌・パラ百日咳菌の作出を試みた。しかしこの方法では、ゲノム配列上で連続した遺伝子しか受容菌に導入することができず、宿主特異性に関する遺伝子が気管支敗血症菌のゲノム上に散在する場合にはそのような遺伝子を同定することができないという致命的な欠点があり、また実際に目的の遺伝子を回収することはできなかった。そこで今回の研究課題では、ゲノム上の存在位置に関係なくランダムに気管支敗血症菌の遺伝子をパラ百日咳菌に導入できる可能性のあるキメラ細菌の作製を計画した。

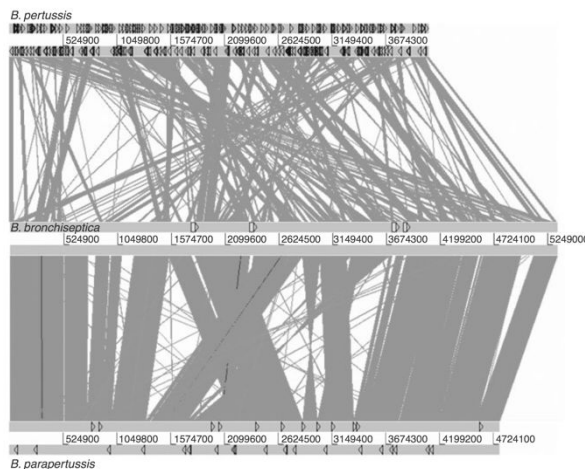


図1: 百日咳菌 (上)、気管支敗血症菌 (中)、パラ百日咳菌 (下) の相同遺伝子のゲノム上の相対位置 (グレー線) と IS の位置 (ゲノム上の三角印) を示す。Nature Genetics 35:32-40, 2003

3. 研究の方法

本研究課題では、ヒトにのみ感染するパラ百日咳菌と広範な哺乳動物種を宿主とする気管支敗血症菌を融合させて、ヒト以外の実験動物に感染するキメラ細菌の作製を試みる。このキメラ細菌のゲノム配列を決定し、ゲノムのキメラ構造の詳細を解析することによって、宿主特異性を左右する細菌遺伝子の同定とその機能を解析し、その結果から病原細菌の宿主特異性決定機構の一端を理解することを目指した。

(1) パラ百日咳菌と気管支敗血症菌のゲノム上のランダムな位置にトランスポゾンを通じて薬剤耐性遺伝子 (それぞれゲンタマイシンとテトラサイクリン耐性遺伝子) を挿入したトラ

ンスポゾンライブラリーを作製した。それぞれのライブラリーから任意に分離したシングルクローンを融合実験に供した。

- (2) パラ百日咳菌と気管支敗血症菌を種々の割合で OD650 値が 0.3 になるように 20 mM HEPES, pH 7.5 – 0.7 M sucrose, 1.34 mM EDTA, 21 μg/ml lysozyme で懸濁し、20 分間室温で静置、塩化マグネシウムを加えて反応を停止させたのち過剰の純粋で希釈して浸透圧ストレスを反応液に与え、さらに 10 分間静置したのち、5% 仔牛血清添加 Bordet-Gengou 寒天培地 (BG-FBS) で生残菌を培養した。
- (3) 回収したゲンタマイシン、テトラサイクリン両耐性菌は、パラ百日咳菌特有遺伝子 (BPP0125, BPP1263, BPP2077, BPP3140, IS1001, IS1002) と気管支敗血症菌特有遺伝子 (BB0128, BB1009, BB1693, BB2450, BB3614, BB4332) を標的としたマルチプレックス PCR, 各薬剤耐性遺伝子と IS1001, IS1002 を対象にしたリアルタイム PCR, 染色体 DNA のパルスフィールド電気泳動を用いて、その交雑性を検討した。
- (4) 最終的に融合細菌候補とした菌については全ゲノム配列を決定した。

4. 研究成果

細菌融合に用いる各試薬の濃度や反応時間を変えて最適条件を探索したところ、上記方法欄で記載した条件で、出発材料の菌数の約 0.01% 程度の割合で、最も効率よくゲンタマイシン・テトラサイクリン耐性菌が分離できることがわかった。複数回の融合実験で回収できた菌を BG-FBS で 3 代まで継代したところ、6 割程度の分離菌が継代後も生残した。これらをそれぞれの菌種特異的な遺伝子を標的とした PCR と、パルスフィールド電気泳動でゲノム構造を調べたところ、いずれもゲノムが混合されることが推測できる結果を得ることができた。寒天培地上でのコロニー形状は、分離株によって異なっており、菌の性状も異なることが期待できた。

さらに、これらの両薬剤耐性変異株を対象に、パラ百日咳菌と気管支敗血症菌それぞれに特異的な複数種類の遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR を用いて変異体のゲノム構成を調べたところ、得られた変異株の 1 割程度 (供試菌 59 株中 7 株) で、ゲノム交雑の可能性を示す結果が得られた。またこれらの両薬剤耐性変異株には、通常には見られないコロニー性状 (ドーム状から拡散性のある平滑コロニー) を示す株 (供試菌 98 株中 43 株) が認められた。

さらに、回収菌の薬剤耐性遺伝子の局在解析やゲノム配列解析の結果、1) 当初の予想よりも短いゲノム領域で組み換えが生じているらしいこと、2) 耐性遺伝子の獲得によらない薬剤耐性化が予想以上に頻繁に生じること、さらに 3) 親株の気管支敗血症菌は、継代培養することによって細胞融合とは関係の無いゲノム構造に逆位が生じた変異株が発生することなどが問題点として明らかとなった (図 2)。

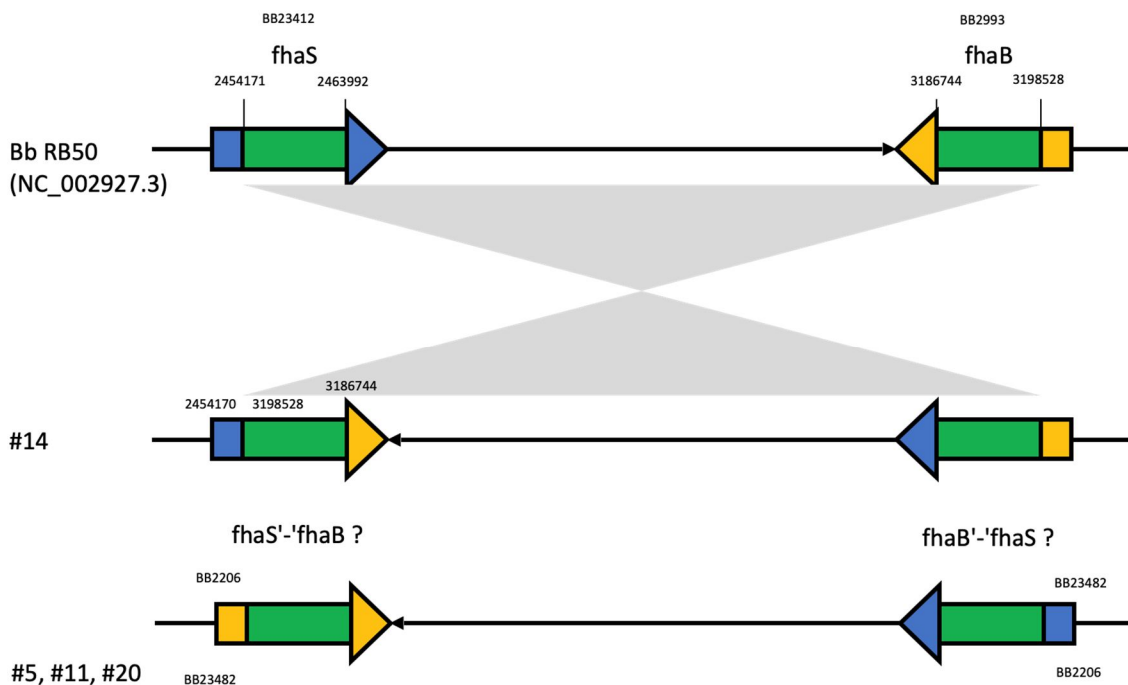


図 2: 回収菌 (#5, #11, #14, #20) で検出された逆位領域。いずれも相同性の高い *fhaS* と *fhaB* の間で逆位が生じている。このうち #14 では *fhaS* と *fhaB* の遺伝子内の配列で組換えが起こっており、#5, #11, #20 では両遺伝子の外側の領域で組換えが起こっている。Bb RB50 株は供試した気管支敗血症菌の親株である。

結果として、本研究課題の期間内に、確実な融合細菌を得て動物実験を実施し、宿主特異性に関与する遺伝子を同定するまでには至らなかった。一方、本研究の成果としては、大量の寒天プレートによる培養と融合細菌のスクリーニングを可能にするため、ボルデテラ用の標準培地である Bordet-Gengou 培地を改良した BG-FBS 培地を考案することができた (Microbiol. Immunol. 2019;1-4. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12742>) こと、短い領域でゲノムを交雑したと思われる融合細菌が得られたこと、などが挙げられる。融合候補細菌は現在も保管しており、将来の機会にさらにそれらの性状について解析し、融合方法の検討を行うべく計画をしているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Hiramatsu Yukihiro, Suzuki Koichiro, Nishida Takashi, Onoda Naoki, Satoh Takashi, Akira Shizuo, Ikawa Masahito, Ikeda Hiroko, Kamei Junzo, Derouiche Sandra, Tominaga Makoto, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 The Mechanism of Pertussis Cough Revealed by the Mouse-Coughing Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.03197-21	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 Hiramatsu Yukihiro, Nishida Takashi, Nugraha Dendi Krisna, Sugihara Fuminori, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Melanin Produced by <i>Bordetella parapertussis</i> Confers a Survival Advantage to the Bacterium during Host Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00819-21	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 Stanek Ondrej, Linhartova Irena, Holubova Jana, Bumba Ladislav, Gardian Zdenko, Malandra Anna, Bockova Barbora, Teruya Shihono, Horiguchi Yasuhiko, Osicka Radim, Sebo Peter	4. 巻 12
2. 論文標題 Production of Highly Active Recombinant Dermonecrotic Toxin of Bordetella Pertussis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 596 ~ 596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12090596	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

1. 著者名 Tsukamoto Kentaro, Shinzawa Naoaki, Kawai Akito, Suzuki Masahiro, Kidoya Hiroyasu, Takakura Nobuyuki, Yamaguchi Hisateru, Kameyama Toshiki, Inagaki Hidehito, Kurahashi Hiroki, Horiguchi Yasuhiko, Doi Yohei	4. 巻 11
2. 論文標題 The Bartonella autotransporter BafA activates the host VEGF pathway to drive angiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17391-2	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 Onoda Naoki, Hiramatsu Yukihiko, Teruya Shihono, Suzuki Koichiro, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Identification of the minimum region of Bordetella pertussis Vag8 required for interaction with C1 inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 570 ~ 573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12799	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 Hiramatsu Yukihiko, Suzuki Koichiro, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Expression of small RNAs of Bordetella pertussis colonizing murine tracheas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 469 ~ 475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12791	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 Teruya Shihono, Hiramatsu Yukihiko, Nakamura Keiji, Fukui-Miyazaki Aya, Tsukamoto Kentaro, Shinoda Noriko, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Ishigaki Keisuke, Shinzawa Naoaki, Nishida Takashi, Sugihara Fuminori, Maeda Yusuke, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Bordetella Dermonecrotic Toxin Is a Neurotropic Virulence Factor That Uses CaV3.1 as the Cell Surface Receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 03146-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.03146-19	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 Hiramatsu Yukihiko, Osada Oka Mayuko, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 63
2. 論文標題 Bordet Gengou agar medium supplemented with albumin containing biologics for cultivation of bordetellae	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 513 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12742	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 Nakamura Keiji, Shinoda Noriko, Hiramatsu Yukihiro, Ohnishi Shinya, Kamitani Shigeki, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 4
2. 論文標題 BspR/BtrA, an Anti- Factor, Regulates the Ability of Bordetella bronchiseptica To Cause Cough in Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00093-19	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 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha, 山口 博之、堀口 安彦
2. 発表標題 Bordetella bronchiseptica utilizes Acanthamoeba castellanii
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平松 征洋、西田 隆司、Dendi Krisna Nugraha、堀口 安彦
2. 発表標題 Bordetella parapertussis produces melanin involved in the bacterial survival during host infection
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀口 安彦
2. 発表標題 ボルデテラの毒素
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平松 征洋、西田 隆司、Dendi Krisna Nugraha、堀口 安彦
2. 発表標題 パラ百日咳菌の産生する褐色色素メラニンの同定と機能解析
3. 学会等名 第74回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha、山口 博之、堀口 安彦
2. 発表標題 <i>Bordetella bronchiseptica</i> utilizes <i>Acanthamoeba castellanii</i> as a temporal niche
3. 学会等名 第74回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha、Hiroyuki Yamaguchi、Yasuhiko Horiguchi
2. 発表標題 <i>Bordetella bronchiseptica</i> utilizes <i>Acanthamoeba castellanii</i> as a temporal niche
3. 学会等名 第19回あわじ感染と免疫国際フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松 征洋、鈴木 孝一郎、西田 隆司、堀口 安彦
2. 発表標題 百日咳の咳発作はリポオリゴサッカライド、Vag8、百日咳毒素の協調作用によって起こる
3. 学会等名 第67回トキシシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀口 安彦
2. 発表標題 感染動物実験から見た百日咳における脳症と咳発作
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松 征洋、鈴木 孝一朗、西田 隆司、堀口 安彦
2. 発表標題 マウス咳発症モデルを用いた百日咳の咳発症メカニズムの解析
3. 学会等名 第15回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松 征洋、鈴木 孝一朗、西田 隆司、堀口 安彦
2. 発表標題 The mechanism of pertussis cough revealed by the mouse-coughing model
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松 征洋、鈴木 孝一朗、堀口 安彦
2. 発表標題 宿主感染時に高発現する百日咳菌small RNAの機能解析
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松 征洋、鈴木 孝一朗、西田 隆司、堀口 安彦
2. 発表標題 マウスモデルから見た百日咳における咳発作発症機構
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha、山口 博之、堀口 安彦
2. 発表標題 Bordetella bronchiseptica utilizes Acanthamoeba catellanii as a temporal niche
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 玉木 優生、西田 隆司、平松 征洋、堀口 安彦
2. 発表標題 新規発光システムを用いた気管支敗血症菌感染のin vivoイメージング手法の構築
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松征洋、岡真優子、堀口安彦
2. 発表標題 Modification of Bordet-Gengou agar medium for cultivation of bordetellae
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha、山口博之、堀口安彦
2. 発表標題 Bordetella bronchiseptica utilizes Acanthamoeba castellanii as a temporal niche
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松征洋、岡真優子、堀口安彦
2. 発表標題 Modification of Bordet-Gengou agar medium for cultivation of bordetellae
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松征洋、照屋志帆乃、中村佳司、福井理、塚本健太郎、堀口安彦
2. 発表標題 Identification of Bordetella dermonecrotic toxin receptor
3. 学会等名 第18回あわじ感染と免疫国際フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 照屋志帆乃、平松征洋、篠田典子、塚本健太郎、中村佳司、石垣圭祐、堀口安彦
2. 発表標題 ボルデテラ壊死毒（DNT）の受容体同定を通じた百日咳病態の解析
3. 学会等名 第66回トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shihono Teruya, Yukihiro Hiramatsu, Noriko Shinoda, Kentao Tsukamoto, Keiji Nakamura, Aya Fukui-Miyazaki, Keisuke Ishigaki, Yasuhiko Horiguchi
2. 発表標題 Identification of Bordetella dermonecrotic toxin receptor
3. 学会等名 ETOX19 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 百日咳に対する鎮咳薬および百日咳に対する鎮咳薬のスクリーニング法	発明者 堀口安彦、平松征洋	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-087332	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関