

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16638

研究課題名（和文）sRNAの機能解析に基づく百日咳菌の感染成立機構の解明

研究課題名（英文）Study on sRNA involved in the establishment of *Bordetella pertussis* infection

研究代表者

平松 征洋（Hiramatsu, Yukihiro）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：90739210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：百日咳菌の病原因子の発現は、これまでの試験管培養時（*in vitro*）の研究成果から、BvgAS二成分制御系によって転写レベルで調節されていると考えられてきた。本研究課題では、宿主内（*in vivo*）における病原性発現制御機構に着目し、*in vivo*で高発現するsmall RNA（sRNA）の一種Bpr4が百日咳菌の主要接着因子である繊維状赤血球凝集素（FHA）の発現量をBvgAS非依存的に転写後レベルで増加させ、本菌の宿主への感染を促していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、これまで知られていなかった百日咳菌の*in vivo*におけるsRNAによる病原性発現調節機構の一端が明らかとなった。百日咳菌の宿主への感染に関するsRNAの報告はこれまでになく、本菌の感染成立機構の理解に新たな側面を付け加えることができたと考えている。さらに、sRNAを中心とした宿主感染時の百日咳菌の病原性発現機構の理解は、百日咳の新たな病原性制御法の開発に貢献するものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：The virulence of *Bordetella pertussis* had long been considered to be regulated by the BvgAS two-component system, the master regulator for gene expression involved in the bacterial pathogenicity. In this study, we focused on small RNA (sRNA) that were highly expressed during *B. pertussis* infection, and indicated that an sRNA designated Bpr4 post-transcriptionally up-regulates the expression of filamentous hemagglutinin (FHA), a major adhesin of *B. pertussis*, in a BvgAS-independent manner, and eventually plays a role in the establishment of the bacterial infection.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳 small RNA

1. 研究開始当初の背景

(1-1) 百日咳の現状

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染によって起こる呼吸器感染症であり、激しい咳発作を引き起こす。WHO によると本疾患による死亡者は、約 10 万人/年と報告されている。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 1950 年代に始まるワクチンの開発・普及によって制御されていたために、かえって百日咳菌の基礎研究が進展しなかった歴史がある。そのことが影響して、百日咳菌の感染成立機構や百日咳特有の激しい咳発作の発症機構の大部分はいまだ不明のままである。これらの理由により、ワクチンの改良や咳発作に有効な治療薬の開発が進まず、再興感染症となった百日咳の制御に苦慮する状況が世界的に続いている。

(1-2) 百日咳菌の病原因子発現制御機構

これまでの *in vitro* 研究の成果から、百日咳菌が多様な病原因子を産生しており、それらの発現が BvgAS 二成分制御系と呼ばれる環境応答システムによって転写レベルで調節されていることが明らかとなっている。本制御系は、宿主環境で毒素・接着因子などを産生する病原性ステージ (Bvg⁺相) と宿主外環境で病原因子の発現を止める非病原性ステージ (Bvg⁻相) の切り替えを司る病原性スイッチとして機能すると考えられてきた。しかし、バイオインフォマティクス分野の発展に伴い、近年の *in vivo* 研究において、百日咳菌の宿主感染時における病原因子の制御を BvgAS だけでは説明できない現象が報告され始めている。

(1-3) 宿主感染時に高発現する small RNA (sRNA) の同定

私たちは、*in vivo* における病原因子の制御機構を明らかにするために、百日咳菌をマウスに感染後、気管に定着した菌の RNA 発現量を RNA-Seq 法を用いて網羅的に解析し、4 種類の sRNA の発現量が *in vitro* 培養時と比較して 10~100 倍に増加していることを見出した。これらの sRNA は、*B. pertussis* sRNA (Bpr) 4, 5, 8, 9 と名付けている。また、本菌の Bvg⁺相と Bvg⁻相における上記 sRNA の発現量を比較した結果、Bpr8 以外の sRNA は BvgAS による制御を受けないことが明らかとなった。

細菌の sRNA は mRNA に結合し、その翻訳効率や安定性を調節することで、タンパク質発現を転写後レベルで制御している。そのため、宿主感染時に発現量の増加する sRNA は、BvgAS 非依存的に病原因子など他のタンパク質の発現を制御していることが予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、私たちの同定した sRNA が百日咳菌の宿主感染に与える影響を検討するとともに、sRNA 自身の発現量が宿主感染時に増加する機構を明らかにすることで、本菌の感染成立機構を sRNA による菌の病原因子発現制御の観点から解析することにある。本研究では、それぞれの sRNA 遺伝子を欠失させた百日咳菌変異株を用いたマウス感染実験により、Bpr4 が本菌の宿主感染を促進する作用を持つことが分かったので、Bpr4 に焦点を当て、標的遺伝子の同定と宿主感染時に発現量が増加する機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

(3-1) 百日咳菌臨床分離株における sRNA の発現

百日咳菌の標準株 (18323)、ワクチン株 (Tohama)、2 種類の臨床分離株 (BP139、BP143) を 7 週齢の C57BL/6J マウスに経鼻感染後 (1×10^7 CFU/mouse)、4 日目の気管を回収し、各 sRNA の発現量を real-time PCR により定量し、*in vitro* 培養時の結果と比較した。また、菌株間による sRNA 発現量の差異や sRNA 遺伝子の塩基配列についても確認した。

(3-2) sRNA 欠損株の感染能

百日咳菌 18323 株を親株として、各 sRNA 遺伝子の欠失変異株を作製し、マウスに経鼻感染後、4 日目の気管内の生菌数を測定した。

(3-3) Bpr4 の標的遺伝子の同定

tac プロモーター (*P_{tac}*) の下流に *bpr4* 遺伝子を連結したプラスミドを作製し、18323 株に導入することで、Bpr4 過剰発現株 (*P_{tac}-bpr4*) を作製した。Bpr4 の発現増加は real-time PCR を用いて確認した。Bpr4 の標的遺伝子は、Bpr4 過剰発現株と親株のタンパク質発現・分泌パターンを SDS-PAGE・CBB 染色により比較することで探索した。Bpr4 と標的遺伝子の実際の結合は、それぞれの RNA を *in vitro* 転写により作製後、アガロースゲル電気泳動により確認した。また、一般的に sRNA の標的遺伝子の結合には RNA シャペロン Hfq が必要な場合が多いため、百日咳菌由来の recombinant Hfq を精製し、Hfq の存在下で RNA 結合実験を行った。

(3-4) 培養細胞に接着した百日咳菌の Bpr4 発現

ヒト肺上皮由来細胞株 Calu-3 とヒトマクロファージ細胞株 THP-1(PMA により分化)に 18323 株を感染させ(100 MOI)、37°C、1 時間培養後、培養上清中の菌(free)と細胞に接着した菌(cell-attached)の両方から RNA を回収し、Bpr4 の発現量を real-time PCR により定量した。また、PFA およびメタノールで固定化した Calu-3 細胞でも同様の実験を行った。

(3-5) GFP 発現レポーター株の作製

宿主感染時における Bpr4 の発現増加が *bpr4* プロモーター依存的な作用であるかを検討するために、*bpr4* プロモーター(*Pbpr4*)の下流に *gfp* 遺伝子を連結したプラスミドを 18323 株に導入したレポーター株(*Pbpr4-gfp*)を作製した。このレポーター株を用いてマウス感染実験を行い、宿主感染時の *gfp* mRNA 発現量を *in vitro* 培養時の結果と比較した。また、Calu-3 細胞を用いた感染実験も実施し、細胞に接着した菌の蛍光強度を指標として *Pbpr4* のプロモーター活性を測定した。

4. 研究成果

(4-1) 百日咳菌臨床分離株における sRNA の発現

百日咳菌の宿主感染時における sRNA (Bpr4, 5, 8, 9) の発現増加は、標準株(18323)、ワクチン株(Tohama)だけでなく、臨床分離株においても確認された(図 1)。一方、菌株間における各 sRNA の発現増加量の差や sRNA 遺伝子の変異は認められなかった。これらの結果は、Bpr4, 5, 8, 9 の宿主感染時における発現増加は、長年実験室で培養されてきた株だけでなく、近年分離されている臨床株においても共通の現象であることを示している。

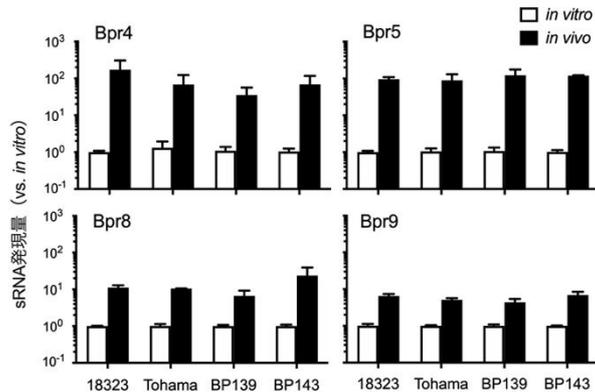


図 1. 各 sRNA の *in vitro*、*in vivo* における発現量

(4-2) sRNA 欠損株の感染能

相同組換えを利用した常法により Bpr4, 8, 9 欠損株を作製することはできたが、Bpr5 欠損株を得ることはできなかった。この原因については明らかにできていないが、Bpr5 は百日咳菌の生存に必須な因子である可能性がある。作製することのできた Bpr4, 8, 9 欠損株を用いてマウス感染実験を行ったところ、Bpr4 欠損株では気管への定着率が親株(wild type: WT)の 1/10 程度に減少していた(図 2A)。また、プラスミドにより Bpr4 の発現を相補した株($\Delta bpr4/bpr4$)では親株と同程度の定着率が確認できたことから(図 2B) Bpr4 は百日咳菌の宿主感染を促進する作用を持つことが明らかとなった。

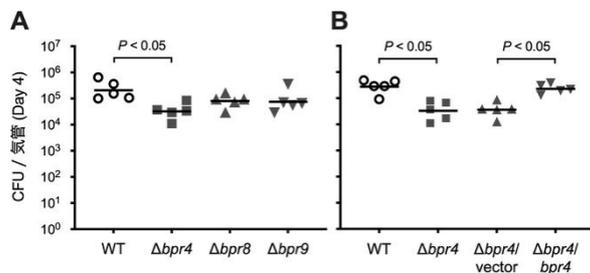


図 2. Bpr4 欠損株のマウス気管への定着

(4-3) Bpr4 の標的遺伝子の同定

Bpr4 欠損・過剰発現株と親株の培養上清中のタンパク質分泌パターンを SDS-PAGE・CBB 染色により比較した結果、Bpr4 の欠損により減少し、Bpr4 の過剰発現により増加するタンパク質を発見した(図 3)。このバンドを切り出し、LC-MS/MS 解析を実施したところ、百日咳菌の主要な接着因子である繊維状赤血球凝集素(filamentous hemagglutinin: FHA)であることが分かった。このタンパク質が FHA であることは、抗 FHA 抗体を用いたウエスタンブロットにより確認している。また、FHA をコードする *fhaB* mRNA の発現量は Bpr4 の欠損、過剰発現により変化しなかったことから、Bpr4 は FHA の発現量を転写後レベルで増加させていることが明らかとなった。

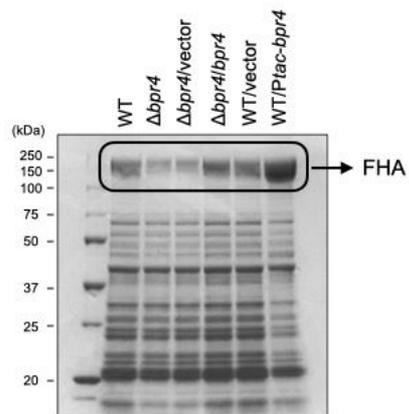


図 3. Bpr4 欠損・過剰発現株のタンパク質分泌パターン

sRNA は標的遺伝子に結合することでその発現を転写後レベルで制御することが知られているので、sRNA の結合部位を予測できるソフトウェア CopraRNA (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/CopraRNA/Input.jsp>) を用いて Bpr4 と *fhaB* mRNA の結合を解析したところ、Bpr4 は *fhaB* mRNA の 5'非翻訳領域 (*fhaB* 5'-UTR) に結合することが推測された。そこで、*In vitro* 転写により作製した Bpr4 と *fhaB* 5'-UTR を用いて、これらの RNA の直接的な結合を解析した結果、Hfq の存在下で Bpr4 が *fhaB* 5'-UTR に結合することが確認できた (図 4)。

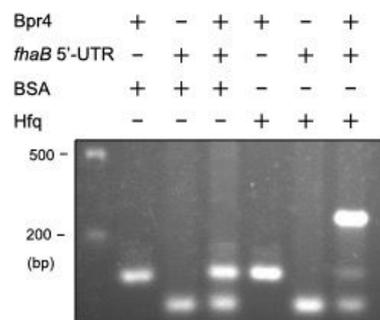


図 4. Bpr4 と *fhaB* 5'-UTR の結合

(4.4) 培養細胞に接着した百日咳菌の Bpr4 発現

宿主感染時の Bpr4 の発現増加がどのタイミングで起こるかを調べたところ、百日咳菌の感染 1 時間後から 10 日目までの全ての期間で、Bpr4 の発現増加が確認できた。この結果は、宿主の免疫応答が Bpr4 の発現に影響を与えているのではなく、百日咳菌が宿主環境を感知し Bpr4 の発現を増加させていることを示唆している。そこで、Calu-3 細胞および THP-1 細胞に接着した百日咳菌の Bpr4 発現量を調べた結果、細胞への接着によっても Bpr4 の発現増加が起こることが分かった (図 5)。さらに、PFA やメタノールで固定した細胞を用いた実験でも同様の結果が得られた。一方、様々なコーティング (コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リシン) を施した培養細胞プレートへの菌の接着では、*in vitro* 培養時と比較し、Bpr4 の発現量に差は認められなかった。これらの結果は、百日咳菌が宿主細胞上の何らかの因子を認識して、Bpr4 の発現増加を誘導していることを示している。

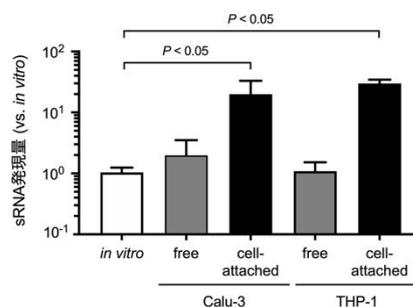


図 5. 百日咳菌の細胞接着による Bpr4 の発現増加

(4.5) GFP 発現レポーター株の作製

百日咳菌レポーター株 (*Pbpr4-gfp*) のマウス感染実験では、*in vitro* 培養時と比較し、*gfp* mRNA の発現量が顕著に増加していることが確認できた。また、Calu-3 細胞に接着した菌でも同様に、菌の蛍光強度の増加が認められた。これらの結果は、宿主感染時における Bpr4 の発現増加がプロモーター依存的な作用であることを示している。また、今後の研究において、本レポーター株は、Bpr4 の発現増加機構を明らかにするための有用なツールになると期待できる。

以上の研究成果から、百日咳菌は宿主細胞を感知することで Bpr4 の発現量を増加させ、BvgAS 非依存的な FHA の発現増加を介して本菌の宿主への定着を促進していることが明らかとなった。百日咳菌の宿主への感染に關与する sRNA の報告はこれまでになく、本菌の感染成立機構の理解に新たな側面を付け加えることができたと考えている。一方、百日咳菌がどの宿主因子を認識し、どのような経路で Bpr4 の発現を増加させているのか解明することは、今後の大きな研究課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Onoda Naoki, Hiramatsu Yukihiro, 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 Yukihiro, 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 Yukihiro, 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 e03146-19
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 Yukihiro, 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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

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作発症機構の解明
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（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 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 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 平松征洋、岡真優子、堀口安彦
2. 発表標題 ボルデテラ属細菌培養用Bordet -Gengou培地の改良
3. 学会等名 第72回日本細菌学会関西支部総会
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、石垣佳祐、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 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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shihono Teruya, Yukihiro Hiramastu, Noriko Shinoda, Kentaro 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、特願2019-087332	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

大阪大学微生物病研究所 分子細菌学分野 https://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp
--

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
---------	---------