

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590391

研究課題名（和文） 細菌表層提示蛋白質を利用した改良型 IVET 法の開発

研究課題名（英文） Development of a modified *in vivo*-expression technology (IVET) using bacterial outer membrane protein as a reporter, immunoprecipitation, and microarray analysis.

研究代表者 安倍 裕順 (ABE HIROYUKI)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00379265

研究成果の概要（和文）：ボルデテラ属細菌の宿主特異性や感染病態を規定する細菌側因子を特定するために、感染宿主内で特異的に発現する遺伝子群を網羅的に解析する方法を考案、確立した。このシステムは*in vivo* expression technology (IVET) と免疫沈降法から構成されており、研究代表者はこれを IVET-IP (*in vivo* expression technology) と名付けた。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel method termed IVET-IP (*in vivo* expressed-tag immunoprecipitation system), which enables us to identify bacterial genes expressed in host environments. This method could be useful to search factors that determine the host specificity and pathogenicity of *Bordetella* spp.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：百日咳菌、気管支敗血症菌、*In vivo* expression technology、

#### 1. 研究開始当初の背景

近年の微生物ゲノム解析の進展により、病原性細菌の保持する遺伝子の全体像が続々と明

らかになってきていた。このような研究の背景の中で様々な培養条件下での細菌の網羅的な遺伝子発現解析が進められ、新規病原性遺

伝子の発見や遺伝子発現制御ネットワークの詳細が明らかになってきたが、感染組織の違いや感染に伴う経時的な環境の変化などを全て試験管内で再現することは不可能であり、感染宿主内での細菌の実際の遺伝子発現を網羅的に明らかにすることは宿主組織や非病原性細菌の混入、細菌由来のmRNAの不安定性などの問題により非常に困難であった。このため、感染宿主内で特異的に発現する遺伝子を間接的に探索する方法として IVET (*in vivo* expression technology)法、RIVET (recombinase based IVET)法や STM (signature tag mutagenesis)法などが開発された。これらの方法は全て、供試菌種の分離にプレートでの増殖を必要としたことと構成的に発現するものだけが選択される傾向があったために、宿主環境での経時的な発現量の変化を比較することが難しいという問題点があった。以上のことから感染宿主内での特定の細菌の遺伝子発現のみを経時的に解析することは非常に困難な状況だった。

百日咳菌は痙攣性の咳発作を特徴とする百日咳の原因菌であり、急性気道感染を起こす。乳児期初期の感染では特徴的な咳がなく、無呼吸発作からチアノーゼ、痙攣、呼吸停止を起こし重篤な場合は死に至る。一方、気管支敗血症菌は百日咳菌と同じボルデテラ属菌であり、多くの哺乳動物の呼吸器に無症候性慢性感染を引き起こす。両菌のゲノム配列から、百日咳菌は気管支敗血症菌の祖先菌から分岐進化してきたこと、これまでボルデテラ属菌種で報告されてきた病原因子の多く(繊維状血球凝集素、パータクチン、気管定着因子、繊毛などの付着因子、アデニル酸シクラーゼ、気管上皮細胞毒素、皮膚壊死毒素などの毒素など)は両菌が共有していること、さらに各菌固有と考えられていた病原性因子の多く(百日咳毒素、血清耐性蛋白

質、III型分泌機構など)も共有していることが明らかにされた。しかしながら病原性遺伝子を共有しているにも関わらず両菌の病原性は上述したように大きく異なっている。多くの病原因子の機能解析が行なわれているが百日咳の発症機序、気管支敗血症菌の慢性感染機構、両菌の宿主特異性の違いなどの解明には未だ至っていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は細菌表層に提示されるオートトランスポーター蛋白質による選択的な菌分離とDNAマイクロアレイ解析とを併用して感染宿主内で特異的に発現する遺伝子群を同定する方法を確立することにある。この方法の有効性を実証する為に、病原性遺伝子を共有しているにも関わらず病原性が著しく異なっている百日咳菌(*Bordetella pertussis*)と気管支敗血症菌(*Bordetella bronchiseptica*)を材料に宿主内での遺伝子発現の相違を明らかにする。その結果、両菌の病原性相違を規定する細菌側因子の特定を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) IVET-IP法の条件検討

#### ①レポーターとなる菌体表層タンパク質とタグの選別

百日咳菌の菌体表層タンパク質(パータクチン、FHA、BrkA、BipA、BcfAなど)と各種標識タグ(FLAG、c-Myc、His)の融合遺伝子を作製して菌体で発現させ、表層露出の程度や各タグに対する抗体による結合度などを検討し、最適のレポーターとなる表層タンパク質-タグの組み合わせを決定した。この際、表層タンパク質の部分的な断片のみをレポーターとして使用して、その発現が菌の機能に付加的な影響を与えないように考慮した。

## ② 免疫沈降法の検討

使用するレポーターのタグに対する抗体の種類を検討した。抗体を用いて菌を分離するための担体（磁性ビーズやアフィニティービーズ）についても数種類のものも検討した。抗体と菌の非特異的な結合を防ぐために BSA 濃度や菌懸濁液の濃度、界面活性剤の種類などブロッキング条件についても検討した。

## ③ マイクロアレイ

気管支敗血症菌の遺伝子発現を網羅的に解析するため、100bp 以上の遺伝子間領域およびその周辺領域を対象にして、 $T_m$  値が近似してかつクロスハイブリダイゼーションが起きにくいオリゴヌクレオチドからなるプローブのマイクロアレイをデザインした。

### (2) IVET-IP 法の有効性検証

本課題では実験動物への感染能が明らかな気管支敗血症菌を使用した。本菌は百日咳菌の近縁種である。気管支敗血症菌を含むボルデテラ属細菌には BvgAS と呼ばれる二成分制御系とその制御下にある遺伝子がいくつか明らかにされている。BvgAS は *in vitro* の 37°C の環境で通常活性化されているが、硫酸マグネシウムの存在下で不活性化する。そこで、BvgAS で制御される代表的な遺伝子のプロモーター領域を使用して、条件検討した IVET-IP 法に用いるレポーター遺伝子を組み込んだベクターを気管支敗血症菌に導入し、硫酸マグネシウムの存在下／非存在下で培養して免疫沈降まで行う。その結果、実際に BvgAS の活性状態に依存して目的のプロモーター領域を含む菌が優勢に回収できるかどうか検証した。

### (3) 感染動物実験モデルにおける IVET-IP 法の使用

ラットに  $10^6$  の IVET-IP 用のライブラリを導入した供試菌を経鼻感染させ、任意の感染期間で気道組織を材料に IVET-IP を実施した。

### (4) 感染ラット気管で発現する遺伝子群の病原性への影響の検討

気管支敗血症菌のラット感染中の遺伝子発現プロファイルの比較を行い、感染過程に重要と考えられた遺伝子の推定を行った。さらに、遺伝子の破壊株および大量発現株を構築し、病原性遺伝子の発現量の違いやラット気管への感染成立の可否から病原性への影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) IVET-IP 法

感染過程において感染宿主内で特異的に発現する細菌遺伝子群探索を目的として改良型 IVET 法を考案した。本法は菌体表層に提示される標識蛋白質をコードする遺伝子上流にゲノムライブラリを挿入し、感染過程で発現するライブラリ導入菌株のみを選択的に回収し、マイクロアレイを用いた網羅的解析のための材料を提供する。本法に用いる菌体表層タンパク質とタグの組み合わせを決定し、試料の調整方法、免疫沈降法を確立した。IVET システムで選択回収されたライブラリを網羅的に解析する目的で気管支敗血症菌のゲノム配列情報から遺伝子間領域が 100bp 長を超える 1469 領域をプローブとするカスタムアレイを設計した。本アレイの使用条件の検討を行い、網羅的解析に使用できる実験条件を確立した。

### (2) IVET-IP 法の有効性検証

培地への  $MgSO_4$  添加により気管支敗血症菌の遺伝子発現が変動することを利用して本法

の実験条件の最適化と有効性の検討を行った。その結果、MgSO<sub>4</sub>添加培地で培養したライブラリ導入菌株群からは Mg<sup>2+</sup>イオンによって正に制御される鞭毛遺伝子群が、MgSO<sub>4</sub>無添加培地で培養したライブラリ導入菌株群からは Mg<sup>2+</sup>イオンによって負に制御される病原性遺伝子群が、それぞれ選択的に回収されることを確認できた。さらに、既知の病原性遺伝子のプロモーターを導入した菌株とラット感染モデル実験系を用いて本法を行うと、感染動物の気管組織から病原性遺伝子のプロモーターを導入した菌株が選択的に回収されることも確認できた。

### (3) 感染動物実験モデルにおける IVET-IP 法の使用

気管支敗血症菌を三種の動物（マウス、モルモット、ラット）に感染させる感染動物モデル実験系を構築した。感染成立後、肺と気道組織から菌を回収する実験手法および条件も確立した。とくにラット感染モデルにおいて、感染 1, 3, 9, 15, 30 日後の気道組織から試料を調製し、感染期間を通じて発現が強く誘導される遺伝子群をリスト化した。これらの遺伝子の機能解析を通して宿主域の広い気管支敗血症菌と宿主をヒトに局限した百日咳菌の感染性の違いを明らかにする分子生物学的基礎知見を提供できると考えている。

### (4) 感染動物実験モデルにおける IVET-IP 法の使用

ラット気管で発現するライブラリの感染後 1, 3, 9, 15, 30 日の経時的探索を行った結果、既知の病原性遺伝子は感染全日程において高発現する遺伝子群、感染経過とともに一過的な発現変動をする遺伝子群、試験管内培養と発現レベルに差が認められないあるいは

低下する遺伝子群に分類することができた。また、感染全日程においてラット気管で高発現する 289 の遺伝子間領域を *rat ivi* (*in vivo induced*) locus として定義し、*rat ivi* locus 制御下にある 259 の遺伝子群から気管支敗血症菌特異的な 28 の遺伝子を同定した。28 遺伝子の中から 6 つの転写制御因子、1 つの鉄輸送関連タンパク質の遺伝子欠失株を作製し、ラット気管への感染実験に供試し気管への定着菌数の比較を行ったところ、2 つの制御遺伝子と鉄輸送関連タンパク質の変異株の定着菌数が野生株と比較して有意に減少した。一方、転写制御因子を強制発現するプラスミドを構築し、試験管内で培養中の気管支敗血症菌の病原性遺伝子発現への影響について野生株と強制発現株の比較を行った。その結果、強制発現株では病原性遺伝子の発現上昇が観察された。さらに百日咳菌内で上記の転写制御因子の強制発現をさせた場合でも、病原性遺伝子の発現上昇が観察された。以上の結果から、百日咳菌と気管支敗血症菌の宿主特異性を規定する原因の一つが両菌固有の遺伝子機能の違いであり、両菌の宿主内環境応答能の違いである可能性が示唆された。以上の成果は気管支敗血症菌特異的な遺伝子導入によって百日咳菌にラット感染能を付与できる可能性を示しており、百日咳菌感染モデル構築に重要な基礎知見であると考えられる。

### 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 4 件)

1. Kamitani S, Kitadokoro K, Miyazawa M, Toshima H, Fukui A, Abe H, Miyake M,

Horiguchi Y. 2010. Characterization of the membrane-targeting C1 domain in *Pasteurella multocida* toxin. J Biol Chem 285(33):25467-25475. (査読有)  
doi: 10.1074/jbc.M110.102285.

2. Fukui-Miyazaki A, Ohnishi S, Kamitani S, Abe H, Horiguchi Y. 2011. *Bordetella* dermonecrotic toxin binds to target cells via the N-terminal 30 amino acids. Microbiol Immunol. 55(3):154-159. (査読有)  
doi:10.1111/j.13148-0421.2010.00300.x

3. Kitadokoro, K., K. Nishimura, S. Kamitani, A. Fukui-Miyazaki, H. Toshima, H. Abe, Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi, S. Yamamoto, H. Karatani, and Y. Horiguchi. 2011. Crystal Structure of *Clostridium Perfringens* Enterotoxin Displays Features of  $\beta$ -Pore-Forming Toxins. J Biol Chem 286(22):19549-19555. (査読有)  
doi:10.1074/jbc.M111.228478

4. Kamitani, S., S. Ao, H. Toshima, T. Tachibana, M. Hashimoto, K. Kitadokoro, A. Fukui-Miyazaki, H. Abe, and Y. Horiguchi. 2011. Enzymatic Actions of *Pasteurella Multocida* Toxin Detected by Monoclonal Antibodies Recognizing the Deamidated Alpha Subunit of the Heterotrimeric GTPase Gq. FEBS Journal. 278(15):2702-2712. (査読有)  
doi:10.1111/j.1742-4658-2011.08197.x

[学会発表] (計 8 件)

1. 安倍裕順、神谷重樹、堀口安彦、東秀明. 2012. 6. 14. 病原細菌の宿主特異性決定因子の

解明. 人獣共通感染症研究拠点シンポジウム. 北海道札幌市北海道大学.

2. 安倍裕順、神谷重樹、福井理、戸嶋ひろ野、堀口安彦. 2012. 3. 27. 感染成立過程で発現する病原細菌遺伝子の網羅的解析法の開発. 日本細菌学会総会. 長崎県長崎ブリックホール.

3. 安倍裕順、神谷重樹、福井理、岡田圭祐、堀口安彦. 2012. 3. 8-3. 20. IVET- IP法: ラット感染中の気管支敗血症菌の遺伝子発現プロファイル解析. 日本細菌学会総会. 千葉県千葉市幕張メッセ国際会議場.

4. 西川明芳、安倍裕順、岡田圭祐、神谷重樹、福井理、堀口安彦. 2012. 3. 8-3. 20. 気管支敗血症菌の新たな病原因子候補. 日本細菌学会総会. 千葉県千葉市幕張メッセ国際会議場.

5. 安倍裕順、神谷重樹、福井理、戸嶋ひろ野、堀口安彦. 2011. 12. 14. 感染成立過程で発現する病原細菌遺伝子の網羅的解析法の開発. 神奈川県パンフィコ横浜.

6. 安倍裕順、神谷重樹、福井理、戸嶋ひろ野、堀口安彦. 2011. 11. 19. 感染成立過程で発現する病原細菌遺伝子の網羅的解析法の開発. 細菌学会関西支部総会. 大阪府大阪府立大学中百舌鳥キャンパス学術交流会館多目的ホール.

7. 安倍裕順. 2011. 8. 9. 感染成立過程で発現する病原細菌遺伝子の網羅的解析法の開発. 細菌学若手コロッセウム. 高知県国民宿舎桂浜荘.

[その他]

ホームページ等

<http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安倍 裕順 (ABE HIROYUKI)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00379265