

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659222
 研究課題名（和文） 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
 研究課題名（英文） Development of a novel technique to monitor gene expression profiles of pathogenic bacteria during infection process
 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

研究成果の概要（和文）：感染宿主内での病原細菌の遺伝子発現パターンを網羅的に解析できる IVET-IP (In vivo-expressed tag immunoprecipitation) 法を開発した。この方法を用いて、ラットへの感染過程における気管支敗血症菌の遺伝子発現パターンを解析した。その結果、代表的な病原因子遺伝子の発現パターンが、これまでに知られている試験管内培養でのそれと全く異なることが明らかとなった。さらに、感染期間を通じて発現量が 2 倍以上増加する 289 の遺伝子領域を見出した。

研究成果の概要（英文）：Analyses for gene expression of pathogens in response to the host environment provide clues to understanding the underlying events to establish the infectious diseases. In this study, we established a novel method named IVET-IP (in vivo expression tag immunoprecipitation system) to enable us to identify genes expressed in the host environment. By using this method, we determined genes expressed in *Bordetella bronchiseptica* in rats during infection process. As a result, we found that the in vivo expression pattern of bacterial virulence genes were quite different from that in vitro. In addition, at least 289 gene loci of *Bordetella bronchiseptica* were found to be expressed >2-fold in rats compared to in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：IVET、マイクロアレイ、気管支敗血症菌

1. 研究開始当初の背景

近年、核酸塩基配列の解読方法や装置が飛躍的に進歩し、細菌学領域でも種々の細菌のゲノムに存在する遺伝子の全体像が続々と明らかにされてきた。また、様々な培養条件における病原細菌の遺伝子発現が解析され、これらの成果は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理解に結びついている。

さらに最近では、病原細菌の感染成立機構を理解する目的で、宿主に侵入した病原細菌

の遺伝子発現のパターンを解析する試みが進められ、マイクロアレイ法や in vivo expression technology (IVET) 法、recombinase-based IVET (RIVET) 法、signature-tagged mutagenesis (STM) 法が利用・開発されてきている。しかしいずれの方法も、宿主から菌体や DNA/RNA を回収するために煩雑な手技が必要であったり、遺伝子発現の経時的変化が追えないなど、種々の短所を抱えている。

そこで申請者は、これらの短所を克服

し、宿主内での病原細菌の遺伝子発現を定量的および経時的に解析できる方法として、**in vivo expression tag-immunoprecipitation (IVET-IP)** 法を考案した。

2. 研究の目的

本研究では、**IVET-IP** 法を確立・実用化するために、気管支敗血症菌を用いてレポーター遺伝子の選別や詳細な条件検討を行う。動物の上部気道に感染する気管支敗血症菌は、近縁の百日咳菌やパラ百日咳菌とともに全ゲノム配列が決定されており、さらに **in vitro** での病原遺伝子の発現制御機構の一部が明らかになっていることなどから、**IVET-IP** 法の検討と応用には格好の材料であると考えられる。実際に、本研究で確立した **IVET-IP** 法を用いて、感染過程における気管支敗血症菌の遺伝子発現パターンを解析し、本菌の感染成立の諸過程の理解にも迫る計画とした。

3. 研究の方法

(1) IVET-IP 法の概要

IVET-IP 法は以下のような手順と原理から構成される。

①供試菌(本計画では気管支敗血症菌)のゲノム断片を菌体表層タンパク質遺伝子上流に挿入したゲノムライブラリを作製する。菌体表層タンパク質には適当な領域にペプチドタグが付加されるように遺伝子をデザインする。

②上記のライブラリプラスミドを親菌に導入して、動物に感染させる。

③任意の感染時期に任意の組織から菌を回収する。この際に抗ペプチドタグ抗体を用いた免疫沈降法などを用いて、ゲノム断片に含まれたプロモータによって下流の表層タンパク質が発現した細菌のみを回収するようにする。

④回収した細菌からライブラリプラスミドを分離し、供試菌の全ゲノム遺伝子をカバーしたマイクロアレイにかける。

⑤マイクロアレイの結果から、任意の感染時期・組織で発現している遺伝子をリスト化する。

(2) 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の選別

本課題で材料に用いる気管支敗血症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とタグの組み合わせを決定する。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する。

②免疫沈降法の検討

使用するレポーターのタグの種類を検討するとともに、タグに対する抗体の種類を検討する。必要であれば二次抗体の使用も検討する。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)についても数種類検討する。また、免疫沈降法にこだわらず、蛍光標識抗体とフローサイトメトリーの組み合わせによって菌を回収する方法も考慮する。さらに、擬似的に動物組織と供試菌を混和するなどして、組織から免疫沈降やフローサイトメトリーに供する菌体を効率よく回収する方法を検討する。

③マイクロアレイのデザインと、試料となる DNA 量の検討と必要菌数の概算

気管支敗血症菌の遺伝子を漏らさず解析するためのマイクロアレイのデザインを検討する。現在、一定の長さ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の起こらな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第1候補に検討を進める計画である。マイクロアレイの作製ができたあと、再現性のある結果を得るために必要な試料 DNA の最小量を調べ、そのために必要な最小菌量を算出し、さらに実際の感染実験の規模(投与菌量および供試動物個体数など)を決定する。

(3) IVET-IP 法の有効性検証

供試菌の気管支敗血症菌には BvgA/BvgS と呼ばれる二成分制御系が存在することが知られており、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。BvgA/BvgS は **in vitro** の 37°C の環境で通常活性化されているが、ナイアシン酸や硫酸マグネシウムの存在下で不活性化する。そこで、BvgA/BvgS 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、上記の実験(2)で決定した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(あるいはフローサイトメトリーによる菌の分離)を行う。その結果、実際に BvgA/BvgS 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する。検証結果が良好でなかった場合、それを実験(2)の検討項目にフィードバックし、**IVET-IP** 法の条件検討をさらに進める。

(4) 実用:感染モデルにおける発現遺伝子のリスト化

実験(2)で決定したデザインで、気管支敗血症菌ゲノム断片を含んだライブラリを作

製し、本菌の宿主となりうるラットに経鼻的に感染させる。本菌は適切な菌量でのラットへの感染によって、咳、流涙、流涕(鼻水)などの軽微な症状を示しながら2ヶ月間定着することが申請者らの予備研究によって明らかとなっている。この感染過程における任意の時期に、鼻腔、上部気道、下部気道、肺を取り出し、菌を回収して IVET-IP を実施し、網羅的に同定された遺伝子をリスト化する。

以上の計画を実施することにより、IVET-IP 法の基本条件を決定し、気管支敗血症菌を用いた 本法を確立を試みた。

4. 研究成果

気管支敗血症菌の、宿主への感染時に発現する遺伝子を網羅的に解析する IVET-IP 法の確立のため、レポーターとなる菌体表層タンパク質の検討をした。その結果、Myc タグペプチドを融合した、本菌由来の BrkA タンパク質のオートトランスポータードメインがレポーターとして適していることがわかった。

さらに Myc-BrkA の遺伝子上流に既知のプロモーター配列を配置した本菌の組換え体を BvgA/BvgS が活性化する Bvg⁺、もしくは不活性化する Bvg⁻の条件で培養し、期待通りにレポーターの発現が誘導されるか、あるいは抑制されるかどうか確かめた。さらに抗 Myc 抗体を用いた免疫沈降やフローサイトメーターによる分画等を検討した結果、抗 Myc 抗体を固定化した磁気ビーズを用いる方法が菌の回収には最も適当であることがわかった。さらに擬似的に動物組織と供試菌を混和して、組織から免疫沈降に供する菌体を効率よく回収する方法を検討した。

また、気管支敗血症菌の遺伝子を網羅的に解析するためのマイクロアレイのデザインを決定(100 bp 以上の距離のある遺伝子間領域、1469 箇所についてセンス側とアンチセンス側それぞれ4種のプローブをアレイにコートした)した。マイクロアレイ解析実施のための必要な試料 DNA の最小量、最小菌量、およびラットに感染させる際の実際の投与菌量および供試動物個体数を決定した。

このように確定した条件で、IVET-IP 法を実施し、ラット気道に感染した気管支敗血症菌において発現される遺伝子の検出を試みた。それぞれ、感染1日、3日、9日、15日、30日目における遺伝子発現量を解析した。既知の病原性遺伝子群発現の経時変化に注目したところ、付着遺伝子 fhaB, III 型分泌機構関連遺伝子群(btrS, bopN, bopC)の感染全期間の恒常的な発現、付着遺伝子 fim2 の一過的な発現抑制と毒素遺伝子 cyaA の一過的な発現誘導などが観察された。さらに感染期

間を通じて発現量が2倍以上増加する289の遺伝子領域を見出した。気管支敗血症菌と同じボルデテラ属細菌の百日咳菌の保有する遺伝子と比較すると、これらのうち28領域が気管支敗血症菌に特有の遺伝子領域であることがわかった。すなわち、この28領域に存在する遺伝子は、気管支敗血症菌特有の感染現象に関係している可能性があると考えられた。そこで、この28領域に存在する遺伝子の推定機能を調べたところ、6領域が転写関連因子、10領域が酵素、4領域が菌体外タンパク質、1領域が鉄利用関連遺伝子、7領域が不明であった。百日咳菌に存在せず、気管支敗血症菌感染時に特異的に発現上昇するこれらの領域の中に、気管支敗血症菌と百日咳菌の宿主特異性や病態の違いに関係する遺伝子が存在すると考えられる。また、感染期間中を通じて高度に発現する遺伝子のうち、気管支敗血症菌のみならず百日咳菌やパラ百日咳菌にも共通に存在する遺伝子がコードするタンパク質の中に、三菌種で共通に有用な防御抗原の候補の存在することが考えられた。

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4件)

1)Orth JHC, Fester I, Siegert P, Weise M, Lanner U, Kamitani S, Tachibana T, Wilson BA, Schlosser A, Horiguchi Y, Aktories K (2013) Substrate specificity of *Pasteurella multocida* toxin for α subunits of heterotrimeric G proteins. *FASEB J* **27**: 832-842. [査読あり]
doi: 10.1096/fj.12-213900

2) Kitadokoro K, Nishimura K, Kamitani S, Fukui-Miyazaki A, Toshima H, Abe H, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Yamamoto S, Karatani H, Horiguchi Y (2011) Crystal Structure of *Clostridium perfringens* Enterotoxin Displays Features of $\{\beta\}$ -Pore-forming Toxins. *J Biol Chem* **286**: 19549-19555 [査読あり]
doi: 10.1074/jbc.M111.228478

3)Kamitani S, Ao S, Toshima H, Tachibana T, Hashimoto M, Kitadokoro K, Fukui-Miyazaki A, Abe H, Horiguchi Y (2011) Enzymatic actions of *Pasteurella multocida* toxin detected by monoclonal antibodies recognizing the deamidated alpha subunit of the heterotrimeric GTPase G(q). *FEBS J* **278**: 2702-2712 [査読あり]

doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08197.x

4) 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**: 154-159 [査読あり] doi: 10.1111/j.1348-0421.2010.00300.x

[学会発表] (計 12 件)

1) Horiguchi Y (2013). Attempts to understand how the pathogenic bordetellae exert specific pathogenicity in specific hosts. 第 155 回日本獣医学会; 2013. 3. 29; 東京大学駒場キャンパス.

2) Nishikawa S, Abe H, Okada K, Kamitani S, Fukui A, Horiguchi Y (2013). A putative virulence factor produced by *Bordetella*. 第 86 回日本細菌学会; 2013. 3. 18; 千葉市幕張メッセ.

3) Abe H, Kamitani S, Fukui A, Okada K, Horiguchi Y (2013). IVET-IP Analysis Monitoring Temporal Gene Expression Profiles of *Bordetella bronchiseptica* in Rats. 第 86 回日本細菌学会; 2013. 3. 18; 千葉市幕張メッセ.

4) 堀口安彦 (2012). 「なぜ百日咳菌はヒトだけに感染して激しい咳発作を起こすのか？」その基礎細菌学的アプローチ. 第 39 回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会; 2012. 11. 9; 大阪市天王寺区役所.

5) Horiguchi Y (2012). A functional difference in adenylate cyclase toxins produced by *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *IEIIS 2012 Homeostatic Inflammation Symposium*; 2012. 10. 25; National Center of Sciences Building, Tokyo.

6) 堀口安彦 (2012). ボルデテラ属細菌の感染特異性決定機構解析へのアプローチ. 第 79 回日本細菌学会北海道支部学術集会; 2012. 8. 28; 北海道帯広市とかちプラザ.

7) 戸嶋ひろ野, 福井理, 安倍裕順, 神谷重樹, 堀口安彦 (2012). Different activities of adenylate cyclase toxins of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. 日本細菌学会; 2012. 3. 27; 長崎市長崎ブリックホール.

8) Horiguchi Y (2012). The molecular action of *Clostridium perfringens* enterotoxin, a pore-forming toxin. 日本細菌学会; 2012. 3. 27; 長崎市長崎ブリックホール.

9) 安倍裕順, 神谷重樹, 福井理, 戸嶋ひろ野, 堀口安彦 (2011). 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. 日本分子生物学会; 2011. 12. 14; 横浜市パシフィコ横浜.

10) 安倍裕順, 神谷重樹, 福井理, 戸嶋ひろ野, 堀口安彦 (2011). 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. 日本細菌学会関西支部総会; 2011. 11. 19; 大阪市大阪府立大学中百舌鳥キャンパス.

11) Horiguchi Y, Kitadokoro K, Nishimura K, Kamitani S, Abe H (2011). The pore-forming mechanism of clostridium perfringens enterotoxintargeting claudins, components of the tight junction. 日本生化学会; 2011. 9. 23; 京都市京都国際会議場.

12) Horiguchi Y, Kitadokoro K, Nishimura K, Kamitani S, Abe H (2011). The pore-forming mechanism of clostridium perfringens enterotoxin targeting claudins, components of the tight junction. *International Union of Microbiological Societies 2011*; 2011. 9. 7; 札幌市札幌コンベンションセンター.

[図書] (計 1 件)

1) Horiguchi Y (2012) Swine Atrophic Rhinitis Caused by *Pasteurella multocida* Toxin and *Bordetella* Dermonecrotic Toxin. *Curr Top Microbiol Immunol* (Springer) **361**: 113-129 doi: 10.1007/82_2012_206

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp/2011Web/Horiguchis_Lab_top.html

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