

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 5月 20日現在

機関番号：12602
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790616
 研究課題名（和文）モラクセラ・カタラーリスの外膜蛋白質に関する薬剤耐性機構および病原性の解析
 研究課題名（英文）Role of *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein in antibiotic resistance and pathogenesis
 研究代表者
 齋藤 良一（SAITO RYOICHI）
 東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・准教授
 研究者番号：00581969

研究成果の概要（和文）：*Moraxella catarrhalis*による感染症の予防および治療に貢献するため外膜タンパク質 OMPCD の機能を解析した。その結果、OMPCD は様々なストレス環境下で安定的に発現することが確認された。さらに OMPCD は菌の発育や形態維持といった生理学的機能、ペニシリン系抗菌薬耐性に関わる機能および付着、血清耐性などの病原性因子としての機能を有することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To contribute to the prevention and treatment of *Moraxella catarrhalis* infection, the present study was undertaken to investigate the function of *M. catarrhalis* OMPCD. Expression of OMPCD was found to be stable under various stress environments. Furthermore, our findings confirmed that OMPCD plays a role in bacterial physiology, including aspects such as bacterial growth and stabilization of bacterial cell morphology; penicillin resistance; and pathogenesis, such as adherence to human epithelial cells and serum resistance.

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	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：モラクセラ・カタラーリス，外膜蛋白質，薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

Moraxella catarrhalis はヒト上気道粘膜に常在する偏性好気性のグラム陰性双球菌であり、小児中耳炎や老人の咽頭炎、気管支炎、肺炎、副鼻腔炎などの呼吸器感染症の重要な起因菌として認識されている。特に近年の欧米諸国において、慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease; COPD）患者の急性増悪に関連すること、肺炎球菌ワクチンの普及に伴い、中耳炎や呼吸器感染症に

おける分離率が増加している等が指摘されている。

臨症分離される本菌の多く（90%以上）は、ペニシリンなどの抗菌薬に耐性を示すことが知られている。これまで、本菌におけるペニシリン系薬耐性機構は、染色体性 β -ラクタマーゼ（BRO-1 および BRO-2）による抗菌薬の不活化、およびポーリンとして知られている外膜タンパク質 M35 の消失による抗菌薬の菌体内蓄積量の低下が報告されている。ペ

ニシリン系薬以外の多くの抗菌薬に感性を示すが、近年その治療に使用される経口セフェム系薬に耐性を示す株も報告されている。また、本菌は病原性の弱い常在菌として長年考えられてきたことから、呼吸器感染症や中耳炎の主要な起病菌である *Streptococcus pneumoniae* や *Haemophilus influenzae* と比較して、病原性や疫学に関する研究報告は少ない。これまで *M. catarrhalis* の病原因子は、細胞付着性、血清耐性、赤血球凝集能などが報告されおり、上記の様々な疾患の惹起と深く関連していることが知られている。また、上記の治療において多額の医療費が必要となることから、*M. catarrhalis* のワクチン開発が望まれている。

M. catarrhalis の外膜タンパク質である outer membrane protein CD (OMPCD) は、臨床分離株の多くが保有するポーリン様タンパク質 (45 kDa) として考えられている。これまでの研究結果から、中耳のムチンや A549 肺線癌由来細胞への付着に関連すること、および血清耐性に関与する報告が成されている。また、高度にアミノ酸配列が保存され、外膜タンパク質に占める蛋白量が多いことからワクチンの標的分子として研究がなされている。しかしながら、多くの細菌においてポーリン (特に OmpC や OmpF) は抗菌薬等における耐性機構に関与するが、OmpA 様タンパク質とも考えられている OMPCD が抗菌薬の耐性に関わるかは不明である。一方、大腸菌では OmpA は細胞形態維持機能を担っているが、*M. catarrhalis* の細胞形態維持に関連するかは不明である。また、*M. catarrhalis* は鼻咽腔より分離されることが多く、咽腔由来の上皮細胞における付着性については分かっていない。血清耐性についても *ompCD* の isogenic mutant を用いた報告は少なく、正確な役割を決定するにはデータが不足して

いる。さらに、鼻咽腔や気道の粘膜環境 (温度変化、pH 変化、浸透圧の変化、鉄の欠乏等) のストレスに対して、OMPCD の発現が異なるかの検討は成されていない。

2. 研究の目的

本研究では *M. catarrhalis* に関連する感染症の予防および治療に貢献するために、

- (1) *M. catarrhalis* の臨床分離株における OMPCD のアミノ酸配列を決定すること、
- (2) 温度、浸透圧、pH 等の変化における OMPCD の発現を解析すること、
- (3) *ompCD* の isogenic mutant を作製すること、
- (4) OMPCD の生理学的機能、抗菌薬耐性に関わる機能、および病原性に関わる機能について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) OMPCD のアミノ酸配列の解析

M. catarrhalis は、16S rRNA 遺伝子の数塩基の違いにより type I、type II および type III の genotype に分類される。今回、*M. catarrhalis* 臨床分離株 32 株 (16S rRNA type I : 15 株、type II : 16 株、type III : 1 株) における *ompCD* の塩基配列を決定した。得られた塩基配列はアミノ酸配列に置換し、CLUSTAL W を用いてアミノ酸の変異部位を解析した。

(2) OMPCD のイムノブロット測定系の構築

ペプチド (TTTVDQTKDMIVQ) をウサギ (日本白色種) に免疫し、抗血清を作製した。抗血清は希釈濃度調整を行い、イムノブロットによる OMPCD の測定系を構築した。その際、*M. catarrhalis* 臨床分離株 32 株および標準菌株 (ATCC49143)、*S. pneumoniae*、*H. influenzae*、*Streptococcus pyogenes*、*Escherichia coli* および *Pseudomonas aeruginosa* を用いて反応性を確認した。

(3) 温度、塩濃度、pHによるOMPDCの発現解析：菌株は*M. catarrhalis*臨床分離株Mc19を用い、BHI液体培地にて①温度（26℃、37℃および42℃）、②塩濃度（0 M、0.25 M、0.5 M、および1 Mの濃度）、③pH（pH 4、pH 5、pH 6、およびpH 7）の条件のもと4時間振盪培養後、(2)で構築した測定系を用いてOMPDCの発現量を解析した。

(4) *ompCD*変異株の作製：標準菌株である*M. catarrhalis* ATCC49143および臨床分離株Mc19について、Tn5を用いて*ompCD*変異株を作製した。さらに*ompCD*変異株を用いて*ompCD*修復株を作製した。

(5) OMPDCの機能解析：OMPDCが①増殖、②細胞形態維持、③抗菌薬（ペニシリン、アモキシシリン、アモキシシリン/クラブラン酸、セフィキシム、クラリスロマイシン、レボフロキサシン）感受性、および④病原性（細胞付着性、自己凝集性、血清耐性）に関わる機能を有するか解析を行った。

(6) 統計学的解析：2項目間の検定はStudent's T-testを用い、3項目間の検定はTukeyの検定を用いて統計学的処理を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) OMPDCのアミノ酸配列

16S rRNA type Iと比較して、16S rRNA type II/IIIでは共通して17位から20位と63位から65位の7アミノ酸の欠失が認められた。16S rRNA type II/IIIでは、さらに264位から272位のアミノ酸変異（268位と269位に2アミノ酸の挿入とL265VとE271Kといった2アミノ酸の置換）等が存在し、16S rRNA type Iと比較して多くのアミノ酸置換を有することが確認された。この結果は以前の報告とは異なり、ワクチンの標的分子として考える上で重要な知見であると考えられた。

(2) OMPDCのイムノブロット測定系の構築
今回作製したOMPDCに対する抗血清は、*M. catarrhalis* OMPDCのみ特異的に反応することが確認された。しかし、菌株によりOMPDCが54 kもしくは55 kの分子量を持つことが示された。これらの分子量の違いがどのような意味を有するかについては今後の検討課題としたい。

(3) 温度、塩濃度、pHによるOMPDCの発現解析

対照となるBHI液体培地（37℃、0 M NaClおよびpH 7の条件）と比較して、検討した条件下におけるOMPDCタンパク質発現量は有意な差を認めなかった。そのため、様々な環境中で発育した*M. catarrhalis*におけるOMPDCは安定的に発現することが示唆された。

(4) *ompCD*変異株の作製およびOMPDCの機能解析

本研究において2株の*ompCD*変異株および修復株を作製した。それらを用いてOMPDCが増殖、細胞形態、抗菌薬感受性、および病原性に関わる機能を保有するか解析した。その結果、親株と比較して、変異株では増殖能の低下、菌体サイズの拡大および細胞壁厚の減少が認められた。さらに変異株は、ペニシリン系抗菌薬MICの低下、HEp-2細胞への付着性の低下、細胞表面の疎水性の上昇および血清感受性を示した。これらの結果から、*M. catarrhalis* OMPDCは生理学的機能、抗菌薬耐性に関わる機能および病原性因子としての機能を有することが明らかとなった。

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1件）

1. Saito R, Matsuoka S, Fujinami Y, Nonaka

S, Ichinose S, Kubota T, Okamura N: Role of *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein CD in bacterial cell morphology and autoaggregation. Res Microbiol 164:236-43, 2013. doi: 10.1016/j.resmic.2012.12.005. (査読: 有)

〔学会発表〕 (計 2 件)

1. 齋藤良一: *Moraxella catarrhalis* 外膜タンパク質 CD は病原性および抗菌薬耐性に関与する. 第 23 回日本臨床微生物学会総会. 2012 年 1 月 21 日. 横浜市.
2. Ryoichi Saito: Characterization of outer membrane protein CD as a vaccine antigen of *Moraxella catarrhalis*. International Union of Microbiological Societies 2011. 7 September, 2011. Sapporo.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 良一 (SAITO RYOICHI)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・准教授

研究者番号: 00581969