

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790415

研究課題名(和文)百日咳菌の宿主特異性決定因子の探索

研究課題名(英文) Identification of bacterial factors that determine the host specificity of bordetellosis.

研究代表者

福井 理 (Fukui, Aya)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：70397743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、感染ラットの気道における百日咳菌の遺伝子発現の変化をIVET-IP法にて網羅的に解析し、宿主特異性に関わる遺伝子候補を探索することであった。本研究において、百日咳菌は高濃度で感染させてもラットに感染を維持できないことが明らかとなった。そのため、当初予定していた比較解析ではなく、ラットに感染を維持できる気管支敗血症菌の遺伝子を導入することにより、ラットへの感染を維持できた百日咳菌をスクリーニングする方法で宿主特異性に関わる遺伝子群が同定できる可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to identify bacterial factors that determine the host specificity of bordetellosis through analyses of the bacterial gene expression during infection by IVET-IP. I established a rat model of bordetella infection, and found that *B. pertussis* did not colonize rats, suggesting that the original plan of this project would be unsuccessful. Therefore, tried was an alternative plan, in which *B. pertussis* derivatives that colonize rats are generated by introduction of genes of *B. bronchiseptica* that shows a wide host range. I expect that genes conferring the wide host range of *B. bronchiseptica* and determining the host specificity could be identified by this strategy.

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 宿主特異性

### 1. 研究開始当初の背景

百日咳は、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の上部気道感染によって起こる伝染性の疾病である。本症は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成人への感染が増加している。また近年、成人罹患者がワクチン未接種乳幼児への感染源になることが懸念されており、再興感染症の一つとして挙げられている。しかし、百日咳の感染メカニズムはほとんどわかっていない。さらに、発作性咳嗽の発症メカニズムも不明なままである。

百日咳菌には、「ヒトにしか感染しない」という病原細菌としての特徴がある。一方、百日咳菌が分類されるボルデテラ属には、同菌に加えて、同様に上部気道感染を起こす病原細菌としてパラ百日咳菌と気管支敗血症菌が知られている。パラ百日咳菌はヒトとヒツジに感染し、気管支敗血症菌はヒトを含む多種類の哺乳動物に幅広く感染する。これら三菌種的全ゲノム配列はすでに決定されており、その結果から3菌種間の各遺伝子の相同性は非常に高く、遺伝学的にきわめて近縁であること、主要病原因子がこれら3菌種でほとんど全て共有されていることなどが明らかになっている。また、それぞれのゲノムサイズは気管支敗血症菌 (5.3 Mbp)、パラ百日咳菌 (4.8 Mbp)、百日咳菌 (4.1 Mbp) と順に小さくなっており、このことから気管支敗血症菌が祖先種に最も近く、ここから遺伝子の欠失と転移が繰り返されてパラ百日咳菌と百日咳菌が系統分化してきたと推測されている。

遺伝子の相同性の高い近縁種であるボルデテラ三菌種の宿主特異性が著しく異なることから、「細菌の宿主特異性」という細菌学上の根本的な疑問を解明するのに、ボルデテラ属細菌は恰好のモデルとなりうると申請者は考えた。先述のように、最も祖先種に近い気管支敗血症菌から遺伝子欠失と組換えによって百日咳菌が派生したのなら、欠失や組換えによって機能が失われた遺伝子で、かつ感染時に発現する遺伝子が、両菌種の宿主特異性の違いに関与している可能性がある。

### 2. 研究の目的

申請者らの研究の最終的な目標は、百日咳菌がヒトのみに特化した病原細菌に進化した原因の分子基盤を理解することにある。この目標に迫るため、本研究課題では、動物モデル感染時の百日咳菌と気管支敗血症菌の遺伝子発現パターンの比較を目指す。気管支敗血症菌は百日咳菌とは異なり、多くの哺乳動物に感染する。両者の異同を明確にすることで、一般の実験動物において気管支敗血症菌で感染が成立し、百日咳菌で感染が成立しないことの主因となる遺伝子群を明らかにする。将来的には、これらの遺伝子産物の機能を解析し、生体応答レベルで百日咳菌のヒ

ト感染特異性の決定因子を理解する予定である。

### 3. 研究の方法

本研究では、気道における百日咳菌の遺伝子発現の変化を網羅的に解析するために、気管支敗血症菌由来のゲノムライブラリーを導入した百日咳菌を気管支敗血症菌の自然宿主であるラットに感染させて、IVET-IP法を行う予定であった。IVET-IP法とは、菌体表層タンパク質をマーカーとすることで、感染動物内での遺伝子発現の経時変化解析を可能にした遺伝子発現解析法である。感染動物から回収した組織よりマーカーを利用して目的菌を免疫沈降によって濃縮すること、また遺伝子の同定にマイクロアレイを用いることで、他種の細菌の混入を防ぎ、かつ分離菌の培養の過程を回避できるので回収菌の性状にバイアスがかからないなど、これまでの方法の短所を全て克服した優れた方法である。この方法は申請者の所属する研究室で開発された (未発表)。

#### (1) IVET-IP 法

本研究課題の IVET-IP法は以下の手順で行う。

- 1) 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の upstream に挿入したゲノムライブラリーを作製する。菌体表層タンパク質の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百日咳菌に導入して、ラットに感染させる。
- 3) 任意の感染時期に感染部位である気道から菌を回収する。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、気管支敗血症菌の全ゲノム遺伝子間領域をプローブ化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、任意の感染時期に発現している遺伝子のプロモータ領域を同定し、その下流の遺伝子をリスト化する。

当研究室ではすでに気管支敗血症菌を親株として、ラットを用いた IVET-IP法を確立しているが、ラットは百日咳菌の自然宿主ではない。また、百日咳菌と気管支敗血症菌では菌体の性状や元来発現する表層タンパク質の種類が若干異なる。そのため、百日咳菌を用いた IVET-IP法を行うにあたって、百日咳菌のラット感染系の検討、百日咳菌に適した免疫沈降法の検討が必要となる。

## (2) 百日咳菌のラット感染条件の検討

IVET-IP 法を実施するためには、1 サンプルあたり  $10^6$  cfu のライブラリー導入菌が必要となる。そのため、百日咳菌のラット感染系を検討し、気道から回収できる本菌の菌数を経時的に調べた。感染後、一定の日数が経ったラットの気管を回収し、D-PBS (-) 中で破碎した後、系列希釈して BG プレート (ボルデテラ属細菌用培養寒天) に播種する。4 日後にコロニーの数をカウントして、回収できた菌数を気管 1 mg 当りで算出した。

また、確実に本菌を投与するため、麻酔の条件、投与方法および投与量を検討した。麻酔薬として、a) エーテル、b) ペントバルビタール、c) メドミチン/ミダゾラム/プロポフォール三剤混合、を検討した。投与方法は、i) 鼻からの吸入、または ii) 鼻腔内投与で、10  $\mu$ l または 50  $\mu$ l の菌液の投与を検討した。

## (3) 百日咳菌に気管支敗血症菌のゲノムライブラリーを導入するためのベクターの作製

百日咳菌のラット感染実験の結果から、IVET-IP 法での遺伝子比較解析は断念せざるを得なかった。一方、高濃度投与した場合でも、百日咳菌はラットで感染を維持できないことが明らかになったので、この事象を利用した新たな方法を考案し、宿主特異性に関連する遺伝子の同定を試みることにした。新同定法では、数十 Kb の遺伝子断片を含む人工染色体ベクターを使用する。気管支敗血症菌の遺伝子断片を含む人工染色体ベクターを百日咳菌に導入し、9 日目以降までラットにおいて感染を維持できた導入菌を回収して導入したゲノム配列を調べることで、ラット感染維持の責任遺伝子候補を絞っていく。

最初の行程は、百日咳菌に気管支敗血症菌のゲノム断片を導入することである。ラットへの感染成立に必要な遺伝子 (群) がゲノム上でどのように分布し、どれくらいの数なのかは予想できないので、できるだけ大きなゲノム断片を百日咳菌に導入したいと考えている。そこでまず、長鎖ゲノム断片 (~200Kb) の百日咳菌への導入を可能にする百日咳菌人工染色体 (BpBAC) の開発を試みる。人工染色体ベクターは低コピーで、安定に維持されることが重要である。百日咳菌 BP136 株より分離された pBP136 プラスミドは、低コピーで、50 世代以上に渡って百日咳菌内で安定維持される。このプラスミドを基に、目的とする人工染色体を作製する。

## 4. 研究成果

### (1) 百日咳菌のラット感染系の確立と経過観察

百日咳菌をラットに種々の条件で感染させ、気管から回収できる菌数を経時的に調べた。その結果、麻酔は三剤混合を使用し、鼻腔内に 10  $\mu$ l の菌液を入れる方法が最も安定

して確実に菌を投与できることがわかった。また、百日咳菌は  $10^8$  cfu / ラットで感染させても感染後 9 日目前後から排除され、15 日目では全例でほぼ検出できなくなることがわかった (図 1)。この結果から、ラットにおける百日咳菌感染は高濃度 ( $10^8$  cfu / ラット) で菌を感染させた場合でも持続しないことがわかった。特に、9 日目前後で菌数の減少

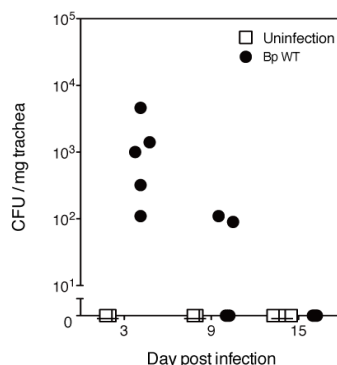


図 1 感染ラットの気管から回収できた百日咳菌 (Bp WT) の菌数の経時変化 ( $10^8$  cfu / ラットで感染させた場合)

が著しかったことから、感染が維持できないなんらかの事由がこの時期にあると予想され、この時期の前後で菌を回収し遺伝子発現の変化を気管支敗血症菌のそれと比較解析することで、その理由を明らかにできる可能性がある。しかし、百日咳菌の排除は非常に速やかであるため、感染一週間後に IVET-IP 法に必要な  $10^6$  cfu の菌の回収は困難であることが明らかとなった。

### (2) ラットに感染する百日咳菌の作製

本研究期間内にまず、長鎖のゲノム断片の導入を可能にする百日咳菌人工染色体ベクター (BpBAC) の作出を試みた。百日咳菌 BP136 株より分離された、低コピーでありながら 50 世代以上安定維持されるプラスミドを利用して、このプラスミドの「低コピー」と「安定維持」に関わる領域を推測し、これら領域と薬剤耐性遺伝子からなるベクターを作製した。このベクターの百日咳菌体内での保有率を検討したところ、選択圧のない試験管培養で 10 回以上の継代培養後でも高効率で保有されることが確認できたため、作製したベクターは BpBAC の候補になりうると考えられた。今後は、この人工染色体ベクターが長鎖ゲノム断片を挿入できるベクターであるかどうか、ラットに感染させたときに百日咳菌菌体内で維持されるかどうかなどを調べ、ゲノムライブラリーを作製し、百日咳菌に導入してラットに感染させる予定である。

5．主な発表論文等

〔その他〕

ホームページ等

[http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp/2011Web/Horiguchis\\_Lab\\_top.html](http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp/2011Web/Horiguchis_Lab_top.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

福井 理 (Fukui Aya)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：70397743