

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460529

研究課題名(和文)百日咳発症に関わる細菌側病原因子の解析

研究課題名(英文) Identification of bacterial virulent factor for whooping-cough development

研究代表者

神谷 重樹 (Kamitani, Shigeki)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：60379089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳の実験動物モデルとして気管支敗血症菌を経鼻感染させたラット感染モデルを用いて客観的に咳嗽回数を測定する方法を確立した。この方法を用いて咳嗽惹起能を失った変異株の解析により、百日咳発症に関わる細菌側病原因子として、タンパク質をコードするmRNAの転写を制御する転写関連因子が咳嗽惹起の病原因子であることを明らかにした。同時に咳嗽惹起に関わる病原因子がタンパク性である可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：It is found that a gene possibly encoding a transcription factor, which controls transcription of genome DNA to mRNA, is responsible for bacterial virulent factor of coughing by intranasal infection of rats with *Bordetella bronchiseptica* as an experimental model of whooping cough.

研究分野：細菌学

キーワード：病原性 百日咳

1. 研究開始当初の背景

百日咳はグラム陰性桿菌である百日咳菌 (*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。患者は本症で特徴的な発作性の咳嗽により無呼吸状態に陥るため、チアノーゼや痙攣さらには脳症を起こし、重篤な場合は死に至る。WHO によると、本疾患により毎年世界で約20万人-30万人が死亡している。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、先進国においても青年期の感染や抗原変異株の出現で罹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。また百日咳は、成人における遷延性咳嗽の一つの原因と考えられている。百日咳は古くから知られた病気であるが、その感染成立機構はほとんど不明である。現行のワクチンは一定の百日咳発症予防効果を期待できるが、感染成立機構が不明なために、ワクチン成分(百日咳毒素や繊維状赤血球凝集素)が主要防御抗原として有効な理由も不明である。この事実は抗原変異株の蔓延が憂慮されている将来に大きな不安材料を与えている。また、百日咳で見られる発作性咳嗽は患者に多大な負荷を強い、ときに死因に直結するが、その発症機構も不明である。そのため、臨床現場では発作性咳嗽には対症療法を持って処置せざるを得ないのが現状である。

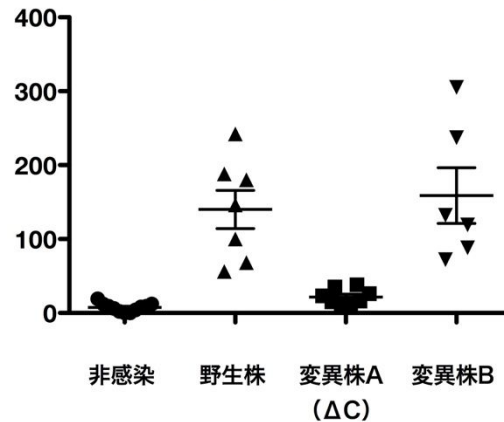
百日咳の感染・発症機構の解析が進展しない理由に、百日咳菌がヒトにしか感染しないという宿主特異性をもつ病原細菌であるために感染動物モデルを確立し難いという問題が挙げられる(引用文献)。そこで、百日咳菌感染のモデル菌として、哺乳動物に広範な宿主域を持ち多くの病原因子を百日咳菌と共有する近縁種の気管支敗血症菌 (*B. bronchiseptica*) (引用文献) がよく利用されている。百日咳菌と気管支敗血症菌ともそれぞれの宿主に経気道的に感染し咳嗽発作を引き起こす。また、これまで報告されてきた百日咳関連の感染動物モデルにはマウスが用いられてきているが、いずれの報告でも、投与菌数がきわめて多いことや感染が短期間で終息すること、また咳嗽などの症状の発現に乏しいことなどから、病状を正確に再現するモデルとは言い難かった。

一方、研究代表者は気管支敗血症菌と種々の動物の組み合わせで、改めて本菌の感染実験スクリーニングを行い、少ない投与菌数で一定期間の感染が成立しかつ咳嗽を再現する、という条件を満たすラット感染動物モデルを作製することに成功し、さらに咳嗽発作の定量化観察の方法を考案した(未発表)。このラット感染動物モデルでは、多量の百日咳菌による感染においても、感染の維持はできないが同様の咳嗽発作が見られることも確認している。

さらに、この感染動物モデルの信頼性を検証する目的で種々の気管支敗血症菌株による感染実験を繰り返し、その過程において、感

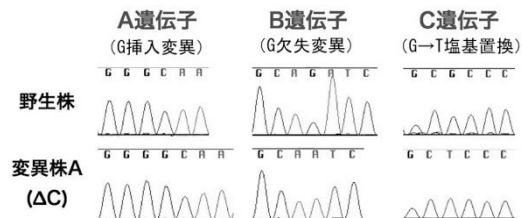
染は成立するが咳嗽発作を起こさない自発性変異株(ΔC株とする)を偶発的に分離することができた(未発表、図1)。この事実は、咳

図1：任意時間での咳嗽回数



嗽発作発症には特定の(おそらく少数か単一の)遺伝子が関与していること、菌の定着増殖と咳嗽発作の発症に直接的な関係はないことを意味している。そこで、この自発性変異株の全ゲノム解析を行い、野生株と塩基配列を比較することによってこの変異株上には3つの変異部位があることをつきとめた(未発表、図2)。これら、変異の存在する3つの遺伝子うちのいずれかが咳嗽発作を惹起する病原因子に関わる遺伝子と考えられる。

図2：同定された変異



以上のことから、本研究ではこれら3つの候補遺伝子から咳嗽惹起の病原因子を同定し、その性状解析から病原因子の機能と宿主応答を解析する。その結果、咳嗽発作の発症メカニズムを明らかにできれば、咳嗽の原因療法開発の道が開かれ、百日咳患者の負荷を軽減し本症の死亡率を低下させることに貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は百日咳の主症状である発作性咳嗽の原因となる細菌側病原因子を解明することである。この目的のために研究代表者が確立した咳嗽発作を客観的に定量化することのできる動物感染モデルを用いて、咳嗽発作を起こさない自発性変異株の全ゲノム解析から明らかになった候補3遺伝子より病原因子を同定する。さらに、その機能と宿主応答を解析することにより咳嗽発作の発症メカニズムを明らかにすることにより、最終的に百

日咳における咳嗽発作の発症機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1)ラット感染モデルによる咳嗽発作の測定
馬脱繊維血を含むBordet-Gengou (BG) 培地上で培養した気管支敗血症菌をStainer-Scholte (SS)液体培地で終夜培養したのち、希釈してさらに培養した対数増殖期させた。この菌を 10^3 cfu/10 μ Lを麻酔下で経鼻的に18日齢のWisterラットに感染させた。感染後のラットを感染翌日から毎日各5分ずつビデオカメラとマイクを用いて映像と音声を15日間記録し、記録したデータを映像編集ソフトAdobe Premier Proを用いて解析して、咳嗽回数を測定した。

(2)気管支敗血症菌変異株の作製
咳嗽発作を起こさない ΔC 株の全ゲノム解析より変異の明らかになった3つの候補遺伝子(A, B, C遺伝子とする)の欠損株と復帰株を枯草菌の*sacB*遺伝子を利用した遺伝子組換え法により作製した。

(3)気管支敗血症菌破砕物の調製
馬脱繊維血を含むBG培地上で培養した気管支敗血症菌をSS液体培地で終夜培養したのち、希釈してさらに培養した対数増殖期させた。遠心により菌を回収後、SS液体培地に再懸濁し、超音波により破砕した。0.22 μ mのフィルターで滅菌後、 10^8 cfu相当の菌破砕液を麻酔下で経鼻的に18日齢のWisterラットに注入した。注入翌日から10日間感染時と同様にして咳嗽回数を測定した。

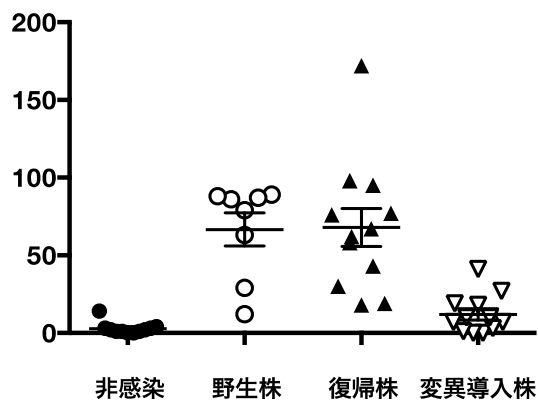
(4)B遺伝子の下流遺伝子の探索
気管支敗血症菌のゲノムを網羅するマイクロアレイを作製したのち、対数増殖期の野生株と ΔC 株からRNAを調製し、ハイブリダイゼーションにより、菌株間の遺伝子発現に差があるものを検出した。

4. 研究成果

(1)咳嗽惹起責任遺伝子の同定
3つの候補遺伝子をそれぞれ欠損した気管支敗血症菌の変異株を作製し、ラット感染モデルにより各変異株感染時の咳嗽回数を測定し、野生株と比較した。その結果、B遺伝子が欠損した変異株を感染した場合には野生株に比べて、咳嗽回数が低下することがわかった。また ΔC 株の変異を野生型に復帰した復帰株を作製し、同様にラット感染モデルにより咳嗽回数を測定したところ、野生型と同等の咳嗽惹起能が認められた。逆に、野生株のB遺伝子に ΔC 株の変異を導入した変異導入株では咳嗽回数が低下した(図3)。このB遺伝子は感染宿主に咳嗽を惹起するボルデテラ属細菌の百日咳菌、気管支敗血症菌、パラ百日咳菌のすべてのゲノムに高度に保

存されていた。この咳嗽惹起の病原因子として同定されたB遺伝子は予想されるアミノ酸配列の相同性から転写関連因子である可能性が高いことが分かった。以上のことより、B遺伝子は咳嗽惹起能に関わることが明らかになり、B遺伝子の下流の遺伝子の遺伝子産物が実際の咳嗽惹起に作用することが示唆

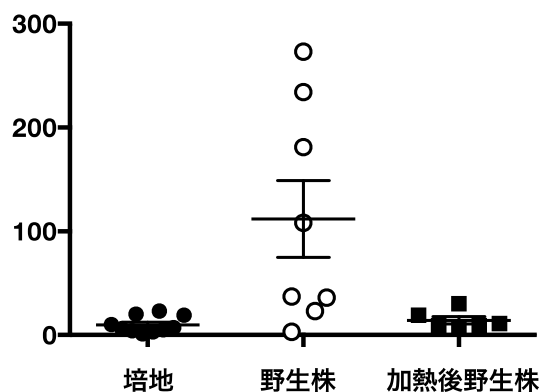
図3：遺伝子Bの咳嗽惹起能への関与



された。

(2)気管支敗血症菌破砕物による咳嗽惹起
 ΔC 株と野生株の菌は再液をラット感染モデルに経鼻的に注入したところ、野生型の菌破砕物を注入したものでのみ、咳嗽が惹起された。また野生型の菌破砕物を56で30分間加熱したのち注入した場合は咳嗽が惹起されなかった(図4)。以上のことより、咳嗽を惹起する病原因子がタンパク質のもので

図4：菌破砕物による咳嗽惹起



あることが示唆された。

(3)B遺伝子の下流遺伝子候補の同定
野生株と ΔC 株を用いたマイクロアレイの結果から、30程度の遺伝子に明らかな遺伝子発現に差異が認められた。これら候補遺伝子には転写関連因子が多く含まれていた。

<引用文献>

Elahi S, et al. (2007) The benefits of using diverse animal models for studying pertussis.

Trends Microbiol 15: 462-468

Parkhill J, *et. al.* (2003) Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nat Genet 35: 32-40

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 3 件)

Abe H, Kamitani S, Fukui-Miyazaki A, Shinzawa N, Nakamura K, and Horiguchi Y. Detection of genes expressed in *Bordetella bronchiseptica* colonizing rat trachea by *in vivo* expressed-tag immunoprecipitation method. Microbiology and Immunology, vol. 59, 2015, 249-61. (査読有)
DOI: 10.1111/1348-0421.12247.

Kamitani S, Miyake M, Hatano M, Yutsudo T, Minamide W, Kato I, and Noda M. Induction of neutral lipid-containing granules by staphylococcal triacylglycerol lipase in cultured cells. SOJ Micorobiology and Infectious Diseases, vol.2, 2014, 1-7(査読有)
DOI:10.15226/sojmid.2014.00117

北所健悟、西村昂亮、神谷重樹、堀口安彦、食中毒を引き起こすウェルシュ菌エンテロトキシンCPEの構造生物学的研究、日本結晶学会誌、55 巻、2013、223-229 (査読有)
DOI:10.5940/jcrsj.55.223

[学会発表](計 4 件)

篠原舞、前谷(安井)実希、矢澤彩香、神谷重樹、歯周病原細菌の増殖に対して食品添加物が及ぼす効果、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 23 日～2016 年 3 月 25 日、大阪府大阪市・大阪国際交流センター

中村佳司、神谷重樹、安倍裕順、新澤直明、堀口安彦、百日咳の病態発生機序解明に向けた感染動物モデルの確立、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 23 日～2016 年 3 月 25 日、大阪府大阪市・大阪国際交流センター

安倍裕順、神谷重樹、福井理、岡田圭佑、堀口安彦、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、第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26 日～2014 年 3 月 28 日、東京都江戸川区・タワーホール船堀

福井理、戸嶋ひろ野、安倍裕順、神谷重樹、堀口安彦、ボルデテラ属細菌が産生するアデニレートサイクラーゼ毒素(ACT)の菌種間における毒素作用の違いについて、第 60 回毒素シンポジウム、2013 年 7 月 17 日～2013 年 7 月 19 日、兵庫県宍粟市・楓香荘

6. 研究組織

(1)研究代表者

神谷 重樹 (KAMITANI SHIGEKI)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：60379089