

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670212

研究課題名(和文) 実験動物に感染する百日咳菌の作製

研究課題名(英文) Development of Bordetella pertussis that infects experimental animals

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトのみに特異的に感染する百日咳菌の病原性を解析できる感染動物モデルを作製するため、百日咳菌と同属細菌で遺伝子の多くを百日咳菌と共有し、かつ種々の実験動物に感染する気管支敗血症菌のゲノム断片を百日咳菌に導入して、実験動物に感染する百日咳菌を作出することを計画した。本課題では、その第一段階として百日咳菌で安定維持される人工染色体の作製を試みた。百日咳菌由来のプラスミドを改変する方法と、大腸菌人工染色体を改変する方法の、2種の方法で作製したベクターはいずれも百日咳菌中で安定に維持されたが、長鎖 DNA 断片 (30 kbp ~) の挿入効率が低かった。現在この点について、改良を試みている。

研究成果の概要(英文)：Bordetella pertussis is known as a human-specific pathogen. In this study, we attempted to generate a mutant strain of B. pertussis that infects a variety of experimental animals, which should facilitate analyses of pathogenicity of this bacterium. For this purpose, we prepared bacterial artificial chromosomes (BACs) that could be maintained in B. pertussis by improving a B. pertussis-derived plasmid or BAC for E. coli. Both the vectors generated by these distinct strategies were found to be stably maintained in B. pertussis, but did not carry a long DNA fragment (30 kbp~), the limitation which should be overcome in the future. Our final goal is to establish animal infection models of B. pertussis that carries the plasmid harboring DNA fragments derived from B. bronchiseptica with a wide host range.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳菌 気管支敗血症菌 動物モデル

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。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。これまでは優れたワクチンの普及により流行が抑えられていたが、ワクチン効果の減弱した青年期の感染やワクチン成分と抗原性の異なる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。百日咳は古くから知られた病気であるが、その感染成立メカニズムはほとんどわかっていない。さらに、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メカニズムも不明である。

百日咳の原因となる百日咳菌の自然宿主はヒトに限られるため、感染動物モデルが成立し難い。現在のところマウスへの大量菌投与の実験系が最も広く利用され、感染病態の解析が進められている。しかし、1) 自然環境ではあり得ない大量の菌数が感染成立に必要である、2) マウスの上部気道には求心性神経が分布していないため咳発作 (咳反射) はそもそもマウスでは起こらない、3) そのため感染度の軽重を肺の炎症度と個体の生死で判定するが、通常百日咳感染では肺の炎症まで進行するものは稀であり、また感染が直接の原因となって患者が死ぬこともない。すなわち、百日咳のマウスモデルは実験の便宜上作製されたものであり、実際の百日咳感染を再現するものではない。このため、マウスモデルを用いた解析結果を百日咳の感染病態の理解に結びつけることは非常に難しい。

一方、申請者らは百日咳菌の近縁種である気管支敗血症菌の少量 (~10 cfu) を幼齢ラットに経鼻投与すると、気道に容易に定着増殖し、しかも咳発作を惹起することを確認した。この定着増殖と咳発作は、まさしく百日咳の感染成立過程と病態を再現するものである。大量の百日咳菌を幼齢ラットに経鼻投与しても感染は持続せず、菌は 15 日以内に排除された。気管支敗血症菌は百日咳菌と同じボルデテラ属の病原細菌で、多くの病原因子を百日咳菌と共有しているが、百日咳菌とは異なり多種類の哺乳動物に感染することができる。また、全ゲノム配列解析の結果から、両菌の祖先種は気管支敗血症菌に近く、そこから多数の遺伝子の転移と欠失が繰り返されて百日咳菌が系統分化したと推定されている。また、百日咳菌で特異的に獲得された明らかな遺伝子領域はみられない。これらの知見を合わせて、申請者は、気管支敗血症菌の遺伝子を百日咳菌に相補することで、気管支敗血症菌のように広い宿主域を持つ百日咳菌を作製できる可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、気管支敗血症菌のゲノム断片ライブラリを導入した百日咳菌をラット感染モデル系に感染させ、定着増殖した菌を回収することによって、ラット感染性を相補する遺伝子を解析する。さらに同定した遺伝子を恒常的に百日咳菌に相補して、ラットに感染できる組換え百日咳菌を作出する。本研究成果により、ラット感染性を相補する遺伝子が同定されれば、その機能を解析することにより、宿主特異性を決定する細菌側因子の解析という新たな研究領域が展開できる。また、ラットに感染する百日咳菌が作出できた場合、それらの菌を利用した百日咳の動物感染モデルが確立でき、病態を再現する動物モデルを用いた百日咳症の解析がはじめて可能になる。すなわち、1) 細菌の宿主特異性はどのように決まるのか? という細菌学上の古くからの課題に解析の糸口を与えることができる、2) 百日咳症の真の動物モデルの作製に結びつく、というふたつの展開が本研究課題成果として期待できる。

宿主特異性の成立メカニズムは細菌学上の古くからの問題である。本研究でラット感染性を百日咳に相補する遺伝子が同定された場合、その解析を通じてこの問題に理解の糸口を与えることになるインパクトは大きい。また一方で、本研究計画は必ずしも成功が約束されたものではなく、実施のためには新しい材料や方法を導入しなければならない。例えばラット感染モデルで定着増殖と咳発作を指標に感染を評価する方法は申請者ら独自の方法であるし、スクリーニングのために大きなゲノム断片を百日咳菌に導入するための方法論も模索しなければならない。このような付随的な課題の解決も、本研究の重要な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 百日咳菌で使用可能な人工染色体ベクターの開発

百日咳菌にラット感染性を付与するために気管支敗血症菌のゲノム断片を導入することが、本研究課題の最初の行程となる。この際、ゲノム上でどのように分布した、どれくらいの数の遺伝子がラット感染に必要なのか予想できないので、できるだけ大きなゲノム断片を百日咳菌に導入することが、この研究の成功率を上げるための重要な問題となる。以上の課題を前提に新たに 100kb 超の断片を挿入可能で、複製、分配と低コピー数での維持が可能である細菌人工染色体ベクターの開発を以下の 2 通りの方法で試みた。

百日咳菌プラスミド pBP136 の改変による百日咳菌人工染色体ベクター (pMIN136 系) の構築

pBP136 は約 41kb の百日咳菌由来プラスミドであり、薬剤耐性遺伝子を保持しないが 50 世代にわたり安定に維持される。多くのグラ

ム陰性菌で複製可能な IncP-1 プラスミドの一種であり、また自己伝達性プラスミドである。そこで、接合伝達に関わる領域(tra, trb)を欠損させ、低コピー複製に関わる領域(trfA, oriV)と安定維持に関わる領域(ccr, par)を残し、さらに三親接合のための oriT を導入した最小プラスミド(pMIN136T)の構築を行った。この pMIN136T を三親接合により百日咳菌に導入した。三親接合はヘルパー株を用いた標準法に従った。

大腸菌人工染色体 BAC の改変による百日咳菌人工染色体ベクター(BpBAC)の構築

pBeloBAC11 は大腸菌人工染色体の一種である。大腸菌の中ではコピー数が 1 に保たれるため、100kb 超の長鎖 DNA のクローニングに適している。しかし、BAC は大腸菌でのみ複製可能である。そこで、pBeloBAC11 と前述した pBP136 の複製機構を組み合わせることで、大腸菌人工染色体を百日咳菌内で複製可能になるように新たなベクターと組換え百日咳菌の開発を試みた。まず、pBeloBAC11 に百日咳菌で機能する複製起点 oriV を新たに導入した。さらに、安定維持機構を付与するために toxin-antitoxin 領域 parDE を導入した。この改変 pBeloBAC11 を BpBAC と命名した。次に、ゲノムに oriV と相互作用する複製因子 trfA を導入した百日咳菌(Bp-trfA)を作製した。この BpBAC ベクターを三親接合によって組換え百日咳菌 Bp-TrfA に導入した。

pMIN136 系ベクターと BpBAC の百日咳菌内での維持効率の検討

pMIN136 系ベクターが百日咳菌内で安定維持されるか否かを解析した。pMIN136T を導入した百日咳菌を薬剤非存在下で液体培養を繰り返した後に、ボルデテラ属選択培地に散布し、100 コロニーをプラスミド選択培地に再度塗布し、プラスミドを持つ百日咳菌の割合を算出した。次に、BpBAC を導入した Bp-trfA も同様の手法によってプラスミドを持つ菌体の割合を算出した。

(2) pMIN136T と BpBAC を用いたゲノムライブラリーの作製

上記(1)で作製した2種類の人工染色体ベクターを用いて、気管支敗血症菌ゲノムライブラリーの作製を行った。ゲノムライブラリー構築の前に、pMIN136T のクローン選別のための LacZ 遺伝子を導入した(pMIN136Tlac)。ゲノムライブラリーの作製に用いる気管支敗血症菌のゲノムは以下のように調整した。低融点アガロースと気管支敗血症菌懸濁液を混合しアガロースプラグを得た。アガロースプラグを溶菌処理し、制限酵素 BamHI 処理を適切な時間処理した後にパルスフィールド電気泳動によって 50-150kb、150-250kb、250kb 以上のアガロースを切り分け、アガラーゼ処理しそれぞれのサイズのゲノム DNA 溶液を分取した。それぞれのゲノムサイズの DNA 溶液と BamHI 処理、続いて脱リン酸化処理した pMIN136Tlac あるいは BpBAC を混合し、

ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応液を HST08 (takara) にエレクトロポレーションによって形質転換し、X-gal による blue-white selection によってゲノム挿入クローンを選別した。ゲノム挿入クローンの獲得効率、挿入断片の長さを考慮し、作製した人工染色体ベクターが気管支敗血症菌ゲノム DNA によるゲノム相補に有効であるか検討を行った。

(3) 長鎖 DNA 挿入プラスミドの百日咳菌体内での維持効率の検討

上記(2)で得られた長鎖 DNA 挿入プラスミドを百日咳菌に三親接合によって導入し、前述と同様の手法によってプラスミドを持つ菌体の割合を算出した。

(4) pMIN136T の動物感染時の維持効率の検討

pMIN136T がラット感染中でも安定に維持されるか否かを検討するために、pMIN136T を導入した百日咳菌をラットに感染させた(10⁸ cfu/rat)。感染3日後と感染9日後にラット気道から回収された菌をボルデテラ属選択培地に散布し、生育した100コロニーをプラスミド選択培地に再度塗布し、プラスミドを持つ百日咳菌の割合を算出した。

4. 研究成果

(1) 百日咳菌で使用可能な人工染色体ベクターの開発

pBP136 を改変して作製した pMIN136T は大腸菌および百日咳菌内で複製可能であることが明らかになった。このことから、今回導入した trfA 遺伝子と oriV は大腸菌と百日咳菌での複製のために十分に機能したことが考えられた。百日咳菌における pMIN136T の維持率は 100%であった。pBeloBAC11 を改変して作製した BpBAC は、野生型百日咳菌への導入は起こらなかったが、trfA 発現百日咳菌(Bp-trfA)への導入に成功した。また、Bp-trfA における BpBAC の維持率は 100%であった。以上のことから、pMIN136T および BpBAC は百日咳菌内で低コピー複製と安定維持を示すことが明らかになった。

(2) pMIN136T と BpBAC を用いたゲノムライブラリーの作製

pMIN136Tlac と BpBAC を用いて、気管支敗血症菌のゲノム DNA をパルスフィールド電気泳動によって分画し、50-150kb、150-250kb、250kb 以上のゲノムを用いたライゲーションを行った。pMIN136Tlac および BpBAC 双方で、50-150kb のゲノムを使用した場合のみゲノム挿入クローンが得られた。このゲノム挿入クローンをランダムに 8 個選び出し、挿入断片の平均長を計算した結果、pMIN136Tlac の場合は平均 29.3kb、BpBAC の場合は平均 23.2kb であった。最も長い挿入断片は pMIN136Tlac の場合は 60kb、BpBAC の場合は 49kb であった。挿入ゲノムの平均長が短いこ

と、長いゲノム断片を用いた場合にクローンが得られなかったことから、物理的なダメージが無いゲノム DNA を調整するなどの改良が必要と思われた。

(3) 長鎖 DNA プラスミドの百日咳菌体内での維持効率の検討

30.2kb の挿入断片を持つ pMIN136T を百日咳菌に導入し、維持効率を解析した。その結果、30.2kb の挿入断片が存在しても 100% の維持効率であることが明らかになった。また、28.5kb の挿入断片を持つ BpBAC を Bp-trfA に導入した。その結果、28.5kb の挿入断片を含む BpBAC は 100% の維持効率を示した。(1) (2) の結果と合わせて、pMIN136T と BpBAC は、低コピー複製・安定維持・長鎖 DNA 導入を可能とすることが明らかになり、百日咳菌人工染色体ベクターとして働くことが示唆された。

(4) pMIN136T の動物感染時の維持効率の検討

pMIN136T を導入した百日咳菌をラットに感染させ、感染 3 日後および 9 日後に気道から回収される菌体数は野生型百日咳菌と同等であった。さらに、回収された菌体のプラスミド保持率は 100% であった。この結果は、pMIN136T が動物感染中でも安定維持機構が働いていることを意味している。

以上の研究成果から、pMIN136T と BpBAC は百日咳菌人工染色体ベクターとして働き、このベクターを用いることでラット感染中も長鎖外来 DNA を維持可能であることが示唆された。作製したゲノムライブラリーは、挿入断片が短く、ゲノム DNA の調整方法やエレクトロポレーション条件に改良を行う必要がある。より長鎖 DNA を含むゲノムライブラリーの作製が目下の課題である。それが作製できた場合、ラット感染系と組み合わせることで、宿主特異性に関わるゲノム領域を同定することが期待される。

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 3 件)

Abe, H., Kamitani, S., Fukui-Miyazaki, A., Shinzawa, N., Nakamura, K., Horiguchi, Y. (2015) Detection of genes expressed in *Bordetella bronchiseptica* colonizing rat trachea by *in vivo* expressed-tag immunoprecipitation method. Microbiol. Immunol. 59: 249-261. doi: 10.1111/1348-0421. 12247. (査読有り)

Okada, K., Abe, H., Ike, F., Ogura, Y., Hayashi, T., Fukui-Miyazaki, A., Nakamura, K., Shinzawa, N., Horiguchi, Y. (2015) Polymorphisms Influencing Expression of Dermonecrotic Toxin in *Bordetella*

bronchiseptica. PLoS One. 2015 Feb 2;10(2):e0116604. doi: 10.1371/journal.pone.0116604. (査読有り)

Okada, K., Ogura, Y., Hayashi, A., Abe, A., Kuwae, A., Horiguchi, Y., Abe, H. (2014) Complete genome sequence of *Bordetella bronchiseptica* S798, an isolate from a pig with atrophic rhinitis. Genome Announcements 2 (3): e00436-14, doi:10.1128/genomeA.00436-14. (査読有り)

〔学会発表〕(計 15 件)

照屋 志帆乃, 中村 佳司, 福井 理, 安倍 裕順, 新澤 直明, 堀口 安彦 (2015). ポルデテラ壊死毒 (DNT) の細胞受容体探索. 第 88 回日本細菌学会総会 ; 2015. 3.26; 岐阜県 長良川国際会議場.

Ishigaki, K., Shinzawa, N., Horiguchi, Y., Genetic dissection of host selectivity in the *Bordetellae* by interspecies genomic complementation. 第 88 回日本細菌学会総会 ; 2015. 3.26; 岐阜県 長良川国際会議場.

Nishikawa, S., Shinzawa, N., Abe, H., Fukui, A., Horiguchi, Y., Biofilm-associated *Bordetella* RTX surface adhesin (BrtA) is expressed during animal infection. 第 88 回日本細菌学会総会 ; 2015. 3.26; 岐阜県 長良川国際会議場.

西川明芳, 新澤直明, 安倍裕順, 堀口安彦. 気管支敗血症菌が宿主感染時に発現する新規付着因子の解析. 第 68 回日本細菌学会関西支部総会 ; 2014.11.22; 兵庫県 兵庫医科大学.

岡田圭祐, 安倍裕順, 小椋義俊, 林哲也, 堀口安彦. 気管支敗血症菌の皮膚壊死毒素 DNT の産生量に関わる塩基多型の解析. 第 67 回日本細菌学会関西支部総会 ; 2014.11.22; 兵庫県 兵庫医科大学.

岡田圭祐, 照屋志帆乃, 安倍裕順, 福井理, 堀口安彦. ポルデテラ壊死毒素研究の最近の進捗について. 第 61 回トキシシンポジウム ; 2014.9.4; 徳島県 ルネッサンスリゾートナルト.

西川明芳, 安倍裕順, 岡田圭祐, 神谷重樹, 福井理, 堀口安彦. 気管支敗血症菌が宿主気道内で発現誘導する新規付着因子の解析. 第 8 回細菌学若手コロッセウム ; 2014.8.6; 北海道 ホテルニセコいこいの村.

岡田圭祐, 安倍裕順, 小椋義俊, 林 哲也, 阿部章夫, 桑江朝臣, 堀口安彦 (2014).

ブタ由来気管支敗血症菌 S798 株のゲノム解析. 第 87 回日本細菌学会総会; 2014.3.26; 東京江戸川区 タワーホール船堀.

安倍裕順, 神谷重樹, 福井理, 岡田圭祐, 堀口安彦(2014). 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; 2014.3.26; 東京江戸川区 タワーホール船堀.

堀口安彦 (2013). *In vivo* expressed tag immunoprecipitation 法による感染時の細菌遺伝子発現の網羅的解析. 第 36 回分子生物学学会; 2013.12.4; 神戸市 ポートアイランド.

西川明芳, 安倍裕順, 岡田圭祐, 神谷重樹, 福井理, 堀口安彦 (2013). 気管支敗血症菌が宿主体内で発現する新たな病原因子候補. 第 66 回日本細菌学会関西支部総会; 2013.11.16. 大阪大学 微生物病研究所.

岡田圭祐, 安倍裕順, 小椋義俊, 林哲也, 阿部章夫, 桑江朝臣, 堀口安彦 (2013). ブタ由来気管支敗血症菌 S798 株のゲノム解析. 第 66 回日本細菌学会関西支部総会; 2013.11.16. 大阪大学 微生物病研究所.

岡田圭祐, 安倍裕順, 小椋義俊, 林哲也, 阿部章夫, 桑江朝臣, 堀口安彦 (2013). ブタ由来気管支敗血症菌 S798 株のゲノム解析. 第 7 回細菌学若手コロッセウム; 2013.8.8. 広島県三原市 広島エアポートホテル.

福井理, 戸嶋ひろ野, 安倍裕順, 神谷重樹, 堀口安彦 (2013). 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; 2013.7.18. 兵庫県宍粟市 楓香荘.

Horiguchi, Y (2013). The pore-forming mechanism of *Clostridium perfringens* enterotoxin. ETOX16; 2013.6.25; Freiburg Germany Hotel Schloss Reinach.

〔図書〕(計 1 件)

堀口安彦, 東京科学同人, 病原微生物学基礎と臨床, 2014, 32-38.

〔その他〕

ホームページ等

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

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者

神谷 重樹 (KAMITANI, Shigeki)
大阪府立大学・地域保健学域・准教授
研究者番号: 60379089
(平成 25 年度に異動)

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