

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860288

研究課題名(和文) 気管支敗血症菌の新規病原因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel virulence factor produced by *Bordetella bronchiseptica*

研究代表者

中村 佳司 (NAKAMURA, Keiji)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：60706216

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)：本研究では、ボルデテラ属細菌の気管支敗血症菌が宿主感染中に発現する新規の病原因子 brtA (*Bordetella* RTX-family Adhesin)の機能解析を行った。brtA遺伝子は、ボルデテラ属細菌の宿主感染に重要な病原性因子が発現しないBvgASが不活性化する条件で発現亢進した。また、変異体解析の結果、本遺伝子産物がin vitroにおけるプラスチック基質表面への接着とバイオフィーム形成において重要であることを明らかにした。宿主感染時におけるBrTAの役割は不明であるが、感染時に発現が明らかに上昇することから、ボルデテラ属細菌の感染時にこの分子がなんらかの寄与をしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the gene brtA (*Bordetella* RTX-family Adhesin), which was identified as one of genes expressed in *B. bronchiseptica* infecting host respiratory tracts, was characterized. Expression of virulence factors in *Bordetella* is mainly controlled by a two-component regulatory BvgAS system, which regulates a bacterial phase conversion between virulent Bvg+ and avirulent Bvg- phases. Immunoblotting and qRT-PCR analysis revealed that BrtA was expressed and secreted from the bacteria in the Bvg- phase. Furthermore, qRT-PCR confirmed that brtA was expressed in the bacteria colonizing rat trachea. Phenotypic analyses of a brtA-deficient strain demonstrated that BrtA is essential for adherence to plastic plate and is involved in biofilm formation of *B. bronchiseptica*. Although the role of brtA during *Bordetella*-infection remains to be elucidated, these results imply that the genes expressed in avirulent Bvg- phase may play a certain role in the course of infection.

研究分野：細菌学

キーワード：ボルデテラ属細菌 気管支敗血症菌 バイオフィーム 二成分制御系

1. 研究開始当初の背景

ボルデテラ属の病原細菌は、宿主動物に呼吸器感染症を引き起こすことが知られている。本菌に分類される代表的な菌種は、特徴的な発作性咳嗽を主徴とする百日咳をヒトに引き起こす百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)のほか、ヒトあるいはヒツジに感染するパラ百日咳菌 (*B. parapertussis*)、ブタ、イヌ、モルモットなど様々な動物種に感染する気管支敗血症菌 (*B. bronchiseptica*)の三菌種が知られている。三菌種は共通して宿主の気道に感染するが、百日咳菌は急性感染、パラ百日咳菌は急性あるいは亜急性感染、さらに気管支敗血症菌は慢性感染または不顕性感染を起こす。このように三菌種の宿主特異性や病状経過は全く異なる。

これら三菌種のゲノム解析は完了している。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、パラ百日咳菌や百日咳菌で新たに獲得された遺伝子はほとんどみられない。このことから三菌種の祖は気管支敗血症菌に近く、そこから遺伝子欠失と組換えが繰り返されて、パラ百日咳菌と百日咳菌が系統進化したと推測されている。このように遺伝学的に近縁でありながら、宿主特異性や感染病態が異なるボルデテラ属細菌は、病原細菌の宿主特異性や感染病態の細菌側の決定因子を解析するための恰好の材料となりうると考えられる。

ボルデテラ属細菌の主要病原因子として報告されている繊維状赤血球凝集素、アデニル酸サイクラゼ毒素および壊死毒素などの三菌種間での相同性は極めて高いことが明らかになっている。従って、「百日咳菌はなぜヒトにのみ感染し、急性経過を呈する症状を起こすのか？」あるいは「気管支敗血症菌はなぜ多くの哺乳動物に慢性感染を起こすのか？」という疑問に対して、既知の病原因子で説明することは難しい。上述のゲノムサイズと宿主特異性および病態の関連性から、気管支敗血症菌には百日咳菌やパラ百日咳菌にはない未知の病原因子が存在し、その機能によって幅広い宿主域や感染病態を有すると考えることができる。

上述の背景から、ボルデテラ三菌種の感染成立機構を理解するためには、三菌種の異同を把握することが重要であると考えられる。先述のように、気管支敗血症菌(に近い祖先種)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であれば、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ものが、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。そこで、研究代表者の所属する研究室では、動物への感染時に発現する細菌遺伝子を網羅的に解析できる IVET-IP (*in vivo* expressed-tag immunoprecipitation)法を開発し、気管支敗血症菌を材料として、自然宿主のラットへの感染時に高度に発現する 289 の遺伝子領域を同

定した。このうち 29 領域が気管支敗血症菌に特徴的な遺伝子領域であった。本研究では、ボルデテラ属細菌の宿主特異性や感染病態の違いを生み出す分子背景の説明を試みるため、同定した 29 領域の中から、*bkn06* と仮称した遺伝子に着目し、機能解析を行うこととした。

2. 研究の目的

bkn06 は百日咳菌には存在せず、パラ百日咳菌では読み枠内に大きな欠損のある遺伝子で、I 型分泌シグナル、細胞傷害毒のモチーフを含む RTX ドメイン、フォンビルブランド因子 A ドメイン(vWFA)、さらにインテグリンで認められる Ig 繰り返し配列 (VCBS/Cad-like repeat; V/C リピート)からなる約 340 kDa のタンパク質 (Bkn06) をコードしている (図 1)。これらのドメイン構造は、*bkn06* が I 型分泌シグナルで菌体外に分泌される付着因子あるいは毒素様因子の遺伝子である可能性を示唆している。ラット感染時に分泌される Bkn06 が、気管支敗血症菌の特異的な病原性に関与している可能性が高いと考え、本タンパク質の機能解析や感染成立への関与を検討した。

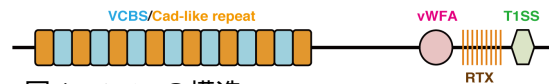


図 1 Bkn06 の構造

3. 研究の方法

(1) *in vitro* および *in vivo* における *brtA* の発現

以降の解析の結果、付着因子として機能することが考えられた本遺伝子を *brtA* (*Bordetella* RTX-family Adhesin)と名付け、以後記述する。ボルデテラは生育条件によって病原性を可逆的に変化させる。この病原性の変化は相変換と呼ばれ、外環境応答機構である二成分制御系に属する BvgAS によって制御される。³⁷ の培養条件下で BvgAS は活性化し、毒素、付着因子や III 型分泌装置のような病原性因子が発現する。低温環境下あるいは硫酸イオンやニコチン酸存在下では、BvgAS は不活性化し、前述の病原性因子は発現せず、鞭毛遺伝子などの発現が上昇している。ボルデテラ属細菌において BvgAS が活性化している状態を Bvg+相、BvgAS が不活性化している状態を Bvg-相と呼ぶ。これまでの研究により、*brtA* は Bvg-相で発現する Bvg 抑制遺伝子であることが報告されていたため、BrtA 特異抗体を用いた Western blotting 法を用いて、種々の条件での試験管培養中における *brtA* の発現を確認した。また、気管支敗血症菌がラットに定着した際、*brtA* が実際に発現しているかを以下の手順で確認した。ラット気道に気管支敗血症菌を接種し、数時間後に回収した。菌体から RNA を抽出し、qRT-PCR 法を用いて *brtA* の mRNA 量を試験管培養時の量と比較した。

(2) BrtA 発現・分泌機構の解析

brtA 遺伝子の上流には、*luxR* 様の転写制御因子 (*luxR*)、I 型分泌機構構成因子 (*hlyD*, *hlyB*, *tolC*)、および機能未知の遺伝子 (*BB_RS05915*) が存在し、それらの遺伝子がオペロンを形成している (図 2)。 *brtA* の発現および分泌が、上流に存在する *luxR* および I 型分泌機構依存的であるかどうかを、*luxR* あるいは *hlyB* 欠失変異株と BrtA 特異抗体を用いた Western blotting 法によって検討した。なお、BrtA が培養上清中に分泌されることは既に確認している。

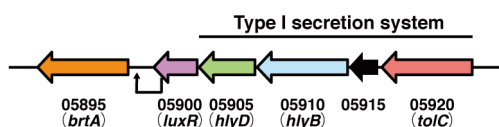


図 2 *brtA* の上流遺伝子領域

(3) BrtA の付着因子としての機能解析

免疫蛍光染色法によって、BrtA が気管支敗血症菌の菌体表面に局在していることが明らかとなった (Data not shown)。そこで、*brtA* 欠失野生株 ($\Delta brtA$) を作製し、Bvg+相あるいは Bvg-相で培養後、ラット肺上皮細胞 (L2 細胞) へ添加した。30 分後気管支敗血症菌と L2 細胞をギムザ染色し、 $\Delta brtA$ の細胞への付着の程度を野生型と比較した。その結果、プラスチック表面への菌の接着に BrtA が必要であることを見出した (研究成果 3 参照) ため、気管支敗血症菌のバイオフィーム形成における *brtA* の関与を以下の手順で検討した。気管支敗血症菌をポリスチレン性のチューブ内で 37、12 時間静地培養した。培養液を除去し、チューブを洗浄した後、メタノールを用いて菌体を固定した。クリスタルバイオレットを用いて菌体を染色し、培養液 (液相) と空気 (気相) との境界面に形成される菌体を確認した。また、GFP を発現する気管支敗血症菌の懸濁液中にスライドガラスを沈め、Bvg-相で培養した。スライドガラス上の気管支敗血症菌を固定、封入後、共焦点顕微鏡を用いて菌体の集積像を観察した。

(4) BrtA が付着因子として機能するために必要なドメインの検索

研究の方法(3)に続き、基質接着およびバイオフィーム形成における BrtA 機能ドメインの検索を行った。図 3 に示すような全長あるいは部分欠失変異体を発現する BrtA を $\Delta brtA$ にベクター相補した。種々の気管支敗血症菌の基質接着能およびバイオフィーム形成能を研究方法(3)に示した方法で評価した。

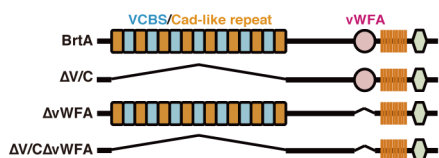


図 3 BrtA の部分欠失変異体

(5) 気管支敗血症菌のラット感染における BrtA の関与の検討

付着因子として機能する *brtA* が、気管支敗血症菌の感染における気道への定着に関与しているかを以下の手順で調べた。 $\Delta brtA$ を自然宿主であるラットに鼻腔内接種し、感染数日後ラットから気道を回収した。気道破壊液をボルデテラ生育培地である BG 培地に接種し、培地上で生育する気管支敗血症菌のコロニー形成単位 (CFU) を計測した。

4. 研究成果

(1) Bvg 抑制遺伝子である *brtA* は宿主感染時に発現する。

試験管培養中に Bvg+相となるボルデテラは宿主感染に重要な病原性因子を発現していることから、宿主感染中においても Bvg+相として生育しており、Bvg-相で発現が上昇する遺伝子は宿主感染時には発現せず、病原性や感染には重要でないと考えられている。Western blotting において、Bvg+相となる試験管培養中に気管支敗血症菌野生型 (WT) の全菌体 (W) および培養上清 (C) に BrtA は検出されず、MgSO₄ 添加によって Bvg-相となった気管支敗血症菌野生型の全菌体および培養上清において BrtA が検出された (図 4)。また、培養条件に関わらず Bvg-相となる気管支敗血症菌変異株 (Bvg- locked)、Bvg+相で活性化する BvgA に反応して発現する転写抑制因子 *bvgR* を欠失させた株 ($\Delta bvgR$) では、いずれも BrtA は発現しており、Bvg+相固定変異株 (Bvg+ locked) では BrtA の発現は確認されなかった (図 4)。さらに、qRT-PCR 法によっても *brtA* が Bvg-相において発現することを確認した (data not shown)。気管支敗血症菌は感染したラットから回収された際、Bvg+相で培養した場合と比較して非常に多量の *brtA* mRNA を発現していた (図 5)。これに加え、*in vivo* Nluc reporter assay によって、*brtA* プロモーター活性が *in vitro* 時と比較して *in vivo* で増大することを確認した (data not shown)。 *brtA* が Bvg 抑制遺伝子でありながら宿主感染時に発現亢進することを示すこれらの結果は、宿主感染中には BvgAS によらない、菌の感染に関わる遺伝子発現機構が働いていることを強く示唆している。

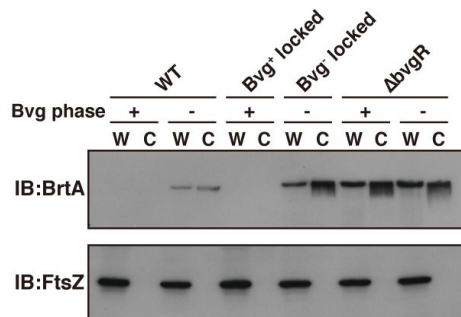


図 4 気管支敗血症菌の BrtA の発現

FtsZ は全菌体の内部標準として使用した。

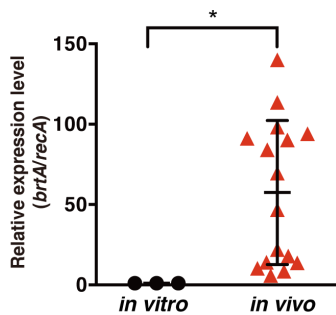


図 5 qRT-PCR による *brtA* mRNA の定量

Bvg+相で培養した菌体中の *brtA* (内部標準 *recA* で補正)量に対する、ラット気道から回収された菌体内の *brtA* 量を示す。エラーバーは標準偏差を、*は *t*-test による $P < 0.01$ を示す。

(2) *brtA* の発現は *luxR* によって制御され、その分泌は *hlyB* を介した I 型分泌機構に依存する。

BrtA 特異抗体を用いた Western blotting において、*BrtA* は気管支敗血症菌 *hlyB* 欠失株 ($\Delta hlyB$)の全菌体中 (W)に検出されたが、培養上清中 (C)に検出されなかった。一方で、*luxR* 欠失株 ($\Delta luxR$)のいずれの画分においても *BrtA* は検出されなかった (図 6)。このことから *BrtA* は I 型分泌機構を介して培養上清中に分泌されること、および *brtA* の発現は *luxR* によって調節されていることが示唆された。また、*luxR* および *tolC* が Bvg-相で発現する (data not shown) ことから、Bvg-相において *brtA* 上流の *tolC* から *luxR* までの遺伝子群が発現することにより、*brtA* は発現、分泌されると考えられた。

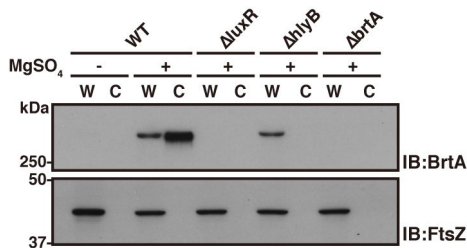


図 6 各変異株における *BrtA* の発現

$MgSO_4$ 添加培地により Bvg-相で培養された菌株由来サンプル中の *BrtA* の免疫染色

(3) *BrtA* は Bvg-相におけるバイオフィーム形成および基質接着に必要である。

気管支敗血症菌の培養細胞への付着における *BrtA* の関与を検討した。気管支敗血症菌は III 型分泌装置によって培養細胞に壊死性の細胞死を引き起こすため、III 型分泌の機能を欠失させた変異株 ($\Delta bscN$)を用いて解析を行った。 $\Delta bscN$ は Bvg+相で培養した場合において細胞に接着し、Bvg-相においては細胞

ではなく、プラスチック基質に接着した (図 7)。Bvg-相における気管支敗血症菌のプラスチック接着能は *bscN* および *brtA* 欠失株 ($\Delta bscN/\Delta brtA$)あるいはカルシウムイオンのキレート剤である EGTA 存在下 ($\Delta bscN+EGTA$)で消失した (図 7)。 *brtA* 欠失株に *brtA* 全長を相補することにより、Bvg-相におけるプラスチック基質接着能は回復した (Data not shown)。これらの結果は、*BrtA* が in vitro において Bvg-相で発現するカルシウムイオン依存的な付着因子であることを示唆している。

菌体表面に局在する付着因子は、バイオフィーム形成に重要であることが知られている。気管支敗血症菌のバイオフィーム形成における *BrtA* の役割を調べた。気管支敗血症菌野生型をポリスチレンチューブで静地培養後染色すると、液相と気相との境界面に集積した菌体によるリングが観察できた (図 8 矢頭)。これに対し、*brtA* 欠失株 ($\Delta brtA$)ではリングが確認されず、*brtA* の相補株 ($\Delta brtA/brtA$)ではリングが形成された (図 8)。また、EGTA 存在下で野生型のリング形成能は消失した。さらに、野生型の培養液において、液相と気相との境界面に GFP で標識された高濃度の菌層が確認されたが、 $\Delta brtA$ では菌体が分散していた (図 9)。以上のことから、Bvg-相において気管支敗血症菌がバイオフィームを展開するために *BrtA* による表面付着が必要であることが示唆された。

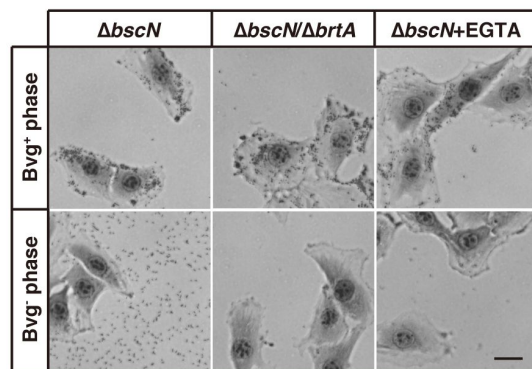


図 7 $\Delta brtA$ の L2 細胞への付着

スケールバーは 25 μm を示す。

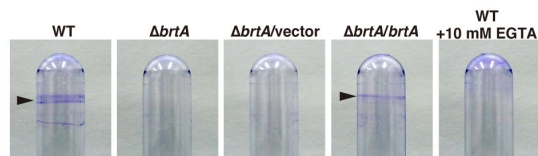


図 8 菌体のリング形成

矢頭は菌体培養液層と気相の境界面に集積した菌体を示す。

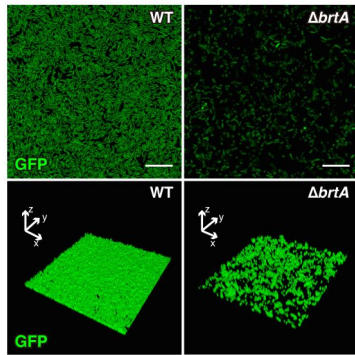


図 9 気管支敗血症菌野生株および $\Delta brtA$ 株のバイオフィーム形成
GFP を発現する気管支敗血症菌を Bvg-相で 24 時間培養した。

(4) V/C リピートおよび vWFA ドメインはともにバイオフィーム形成および基質接着に必要である。

BrtA はボルデテラ属菌株間において完全に保存されておらず、特に V/C リピート数が異なる。BrtA 機能における、V/C リピートの関与を調べるため、V/C リピートを欠失させた BrtA を $\Delta brtA$ に発現させ、付着因子としての機能を評価した。V/C リピート欠失 BrtA 発現株 ($\Delta brtA/\Delta V/C$)はバイオフィームを形成しなかったが、プラスチックへの付着はある程度観察された(図 10 矢印)。また、vWFA ドメイン欠失 BrtA 発現株 ($\Delta brtA/\Delta vWFA$)および V/C リピート、vWFA ドメイン両欠失 BrtA 発現株 ($\Delta brtA/\Delta V/C/\Delta vWFA$)はいずれも、表面付着能およびバイオフィーム形成能を示さなかった(図 10)。BrtA 特異抗体を用いた Western blotting の結果、これらの BrtA 部分欠失株はそれぞれ予想されたサイズの BrtA を分泌していた (Data not shown)。これらのことから、BrtA の V/C リピートおよび vWFA ドメインは基質への接着およびバイオフィーム形成に必要であるが、BrtA の分泌には関与していないことが示された。

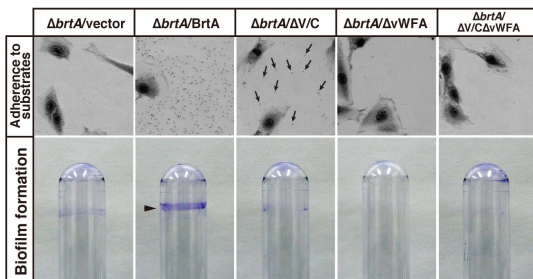


図 10 BrtA 部分欠失変異株の基質接着(上段)およびバイオフィーム形成(下段)
矢印は基質に接着した菌体を、矢頭は菌体のリングをそれぞれ示す。

(5) *brtA* は気管支敗血症菌のラット気道への定着に必須ではない。

brtA 欠失気管支敗血症菌 ($\Delta brtA$)の気道への定着菌数を野生型と比較した。いずれの感染後日数においても、 $\Delta brtA$ の定着菌数は野生型と大差なかった(図 11)。この結果は BrtA の発現が増大する Bvg-相で培養した気管支敗血症菌をラットへ接種した場合でも変わらなかった (Data not shown)ことから、宿主感染時における BrtA の役割は不明なままであり、今後の検討課題である。

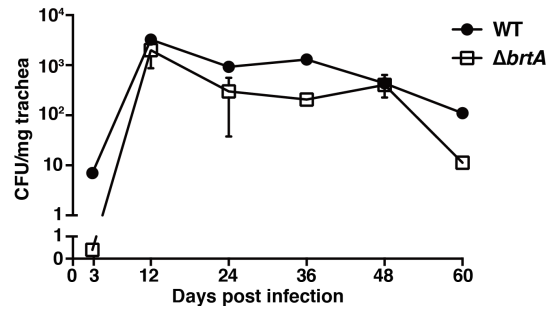


図 11 気管支敗血症菌野生株および $\Delta brtA$ 株のラット気道への持続感染

感染後日数においてラット気道から回収された気管支敗血症菌の気道 1 mg あたりの CFU の平均および標準偏差 (N=4)を示す。

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)

Sayaka Nishikawa, Naoaki Shinzawa, Keiji Nakamura, Keisuke Ishigaki, Hiroyuki Abe, Yasuhiko Horiguchi, The bvg- repressed gene *brtA*, encoding biofilm associated surface adhesin, is expressed during host infection by *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology and Immunology*, 査読有, 60 巻, 2016, 93-105. DOI: 10.1111/1348-0421.12356

〔学会発表〕(計 8 件)

福井理 他、百日咳菌が産生するアデニレートサイクラーゼ毒素は気道の組織障害を引き起こす、第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 23 - 25 日、大阪国際交流センター(大阪)。

中村佳司 他、百日咳の病態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 - 25 日、大阪国際交流センター(大阪)。

新居祐規 他、Analysis of roles of pertussis toxin in infection、第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 23 - 25 日、大阪国際交流センター(大阪)。

鈴木孝一郎 他、Seeking novel antigens against *Bordetella pertussis* infection、第 89

回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 23 - 25 日、大阪国際交流センター（大阪）。

Aya Fukui-Miyazaki 他、Adenylate cyclase toxin from *B. pertussis* but not *B. bronchiseptica* causes tracheal tissue damage during infection、第 68 回日本細菌学会関西支部総会、2015 年 11 月 28 日、京都薬科大学（京都）。

西川明芳 他、気管支敗血症菌のバイオフィルム関連付着因子 *brtA* は Bvg 抑制遺伝子でありながら宿主感染時に発現している、第 68 回日本細菌学会関西支部総会、2015 年 11 月 28 日、京都薬科大学（京都）。

中村佳司 他、百日咳の病態機序解明に向けた感染動物モデルの確立、第 9 回細菌学若手コロッセウム、2015 年 11 月 23 - 25 日、KKR ホテル敬天閣（鹿児島）。

西川明芳 他、気管支敗血症菌のバイオフィルム関連付着因子 *brtA* は Bvg 抑制遺伝子でありながら宿主感染時に発現している、第 9 回細菌学若手コロッセウム、2015 年 11 月 23 - 25 日、KKR ホテル敬天閣（鹿児島）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 佳司 (NAKAMURA Keiji)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：60706216