

139. 百日咳菌の宿主感染時に高発現する sRNA の機能解析

平松 征洋

大阪大学 微生物病研究所 分子細菌学分野

Key words : 百日咳菌, small RNA, ベン毛, ガングリオシド, 宿主感知機構

緒言

百日咳は、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) のヒト気道への感染によって起こる、特徴的な咳発作を伴う呼吸器感染症である。本症は、1950 年代に始まるワクチンの開発・普及によって制御されていたが、近年では、ワクチンが広く普及した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層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などで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。日本国内でも、これまでの百日咳の発生動向調査が指定医療機関（小児科）の定点把握であったところ、近年の患者数の増加傾向を鑑みて、2018 年からは成人を含む全数把握疾患に指定されている。国立感染症研究所によると、2018、2019 年には国内で 1 万人以上の患者が報告されている。百日咳の治療にはマクロライド系抗生物質が第一選択薬として菌の排除に使用されるが、近年、我が国を含む世界各国でマクロライド耐性百日咳菌の分離が報告されている。さらに、米国疾病予防管理センター（CDC）が本菌の薬剤耐性化を潜在的脅威として注意喚起していることもあり、現在、多くのグループが百日咳の新たな感染制御法の開発を模索している。

百日咳菌は毒素や接着因子など多様な病原因子を産生しており、人工的に (*in vitro* で) 培養した菌を用いて得られたこれまでの研究成果から、これら病原因子の発現は単一のマスターレギュレーター (BvgAS 二成分制御系) によって転写レベルで制御されていると理解されてきた。しかし、宿主感染時 (*in vivo*) の菌の遺伝子発現を解析した近年の研究において、実際の宿主内における百日咳菌の遺伝子発現プロファイルは *in vitro* では見られない独特のパターンを示し、病原因子の発現は必ずしも BvgAS に依存しないことが明らかとなってきた [1, 2]。そこで私たちは、百日咳菌の *in vivo* における病原因子の発現制御機構に着目し、これまでに宿主感染時の百日咳菌において高発現する 9 種類の small RNA (sRNA) を同定した [3]。 *B. pertussis* sRNA (Bpr) 1~9 と命名したこれらの sRNA のうち、Bpr4、5、8、9 の発現量は *in vitro* 培養時と比較して宿主感染時に 10~100 倍に増加しており、9 種類の sRNA のうちの 8 種類は、BvgAS による制御を受けていないことを発見した。本研究では、私たちが発見した sRNA が百日咳菌の病原性に与える影響を検討し、Bpr4 が百日咳菌の主要な接着因子である繊維状赤血球凝集素 (filamentous hemagglutinin : FHA) の発現量を転写後レベルで増加させ、本菌の宿主への感染を促進させることを明らかにした。さらに、宿主感染時における Bpr4 の発現増加に繋がるシグナル伝達経路は、百日咳菌のフラジェリンが宿主細胞表面上のガングリオシドに結合し、ベン毛の回転運動が阻害されることで作動することを見出した [4]。

方法および結果

1. Bpr4 が百日咳菌の感染を促進させるメカニズム

宿主感染時に発現量が増加する sRNA について、Bpr4、8、9 を欠損する百日咳菌変異株 ($\Delta bpr4$ 、 $\Delta bpr8$ 、 $\Delta bpr9$) を作製することができた。各菌株をマウスに経鼻感染させ、気管への定着率を算出したところ、 $\Delta bpr4$ では感染能が低下していた (図 1a)。SDS-PAGE および CBB 染色を用いて、Bpr4 欠損が百日咳菌のタンパク質発現パターンに与える影響を検討したところ、Bpr4 の欠損により約 200 kDa 付近のタンパク質の発現量が減

少ししていることを発見した。このタンパク質の発現は、プラスミドを用いた **Bpr4** の相補 (*p**bpr4***) により野生株 (wild-type : WT) と同程度となり、**Bpr4** の過剰発現 (*Ptac-bpr4*) で発現量が増大した (図 1b)。LC-MS/MS 解析の結果、このタンパク質は **FHA** と同定され、**FHA** の発現パターンが同様の挙動を示すことをウエスタンブロットにより確認した (図 1c)。一般に、sRNA は標的となる遺伝子に結合し、様々なタンパク質の発現を制御することが知られているので、**Bpr4** と **FHA** をコードする *fhaB* mRNA の結合を、IntaRNA を用いて解析したところ、**Bpr4** は *fhaB* mRNA の 5'非翻訳領域 (5'-untranslated region : 5'-UTR) に結合することが予測された。そこで、**Bpr4** と *fhaB* 5'-UTR を合成し、その結合を確かめたところ、RNA シャペロンである **Hfq** の存在下で複合体の形成が確認された (図 1d)。**Bpr4** と *fhaB* 5'-UTR の結合が **FHA** の発現増加を引き起こす経路を探索したところ、RNaseE をコードする *rne* 遺伝子のプロモーター領域を欠損した百日咳菌変異株 (Δ *Prne*) では **FHA** の発現量が増大しており、一方で、 Δ *bpr4* Δ *Prne* では **FHA** の発現低下が見られなかった。さらに、 Δ *Prne* で **Bpr4** を過剰発現させても、さらなる **FHA** の発現増大は認められなかった (図 1e)。これらの結果より、**Bpr4** は *fhaB* 5'-UTR に結合することで、RNaseE による *fhaB* mRNA の分解を抑制し、**FHA** の発現亢進を誘導することで百日咳菌の宿主への感染を促進させていることが分かった。

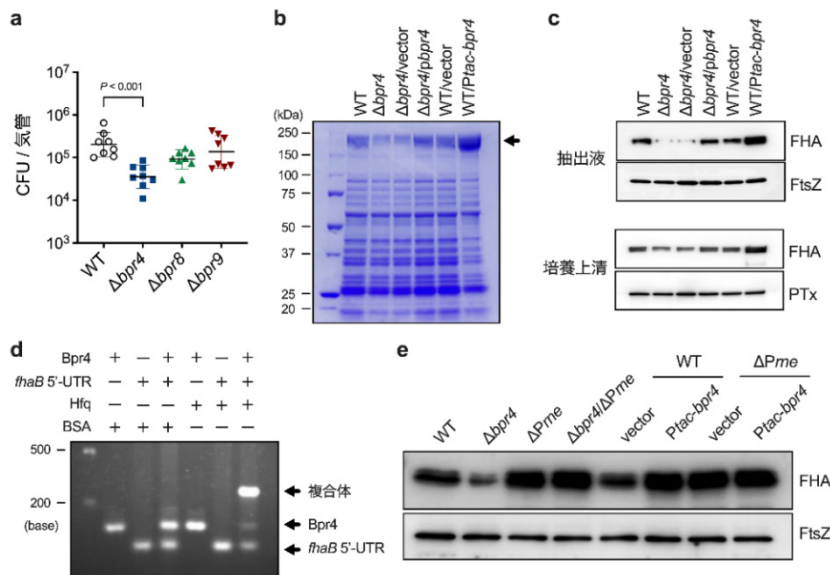


図 1. **Bpr4** による **FHA** の発現増加を介した百日咳菌の感染能の亢進

- 各 sRNA 欠損株をマウスに感染させ、気管に定着した菌数 (colony forming unit, CFU) を算出した。統計解析には、Kruskal-Wallis test および Dunn の多重比較法を使用した。
- 百日咳菌の培養上清を TCA 沈殿により濃縮し、SDS-PAGE で分離後、CBB 染色を行った。矢印部分のバンドは LC-MS/MS の結果、**FHA** であることを明らかにしている。
- e) 百日咳菌の抽出液 (c, e) および培養上清中 (c) の **FHA** をウエスタンブロットにより検出した。**FtsZ** および百日咳毒素 (pertussis toxin : PTx) は内標準として使用した。
- 各 RNA の結合をゲルシフトアッセイにより解析した。牛血清アルブミン (bovine serum albumin : BSA) は陰性対象として使用した。

2. **Bpr4** の発現量が増加するメカニズム : 細菌側因子の同定

培養細胞を用いた百日咳菌の感染実験系で **Bpr4** の発現量を測定したところ、ヒト肺上皮由来細胞株 Calu-3 とヒトマクロファージ THP-1 細胞に接着した百日咳菌 (cell-adhering) で **Bpr4** の発現増加が見られた (図 2a)。この結果から、百日咳菌は宿主細胞表面上の因子を感知することで **Bpr4** の発現を亢進させていることが分かった。**Bpr4** 発現増加に繋がるシグナル伝達経路について、まずは関与する細菌側の因子の同定を試みた。百日咳菌の持つ 13 種類の二成分制御系のセンサーキナーゼを欠損した変異株を用いて、細胞接着時における **Bpr4** の発

現量を測定した結果、RisK 欠損株 ($\Delta risK$) では Bpr4 の発現増加が観察されなかった。RisK のレスポンスレギュレーターである転写因子 RisA を欠損した株 ($\Delta risA$) でも同様に、細胞接着時およびマウス感染時に Bpr4 の発現増加が見られなくなった (図 2b)。RisK/RisA 二成分制御系は、細菌のセカンドメッセンジャーである cyclic di-GMP (c-di-GMP) の濃度依存的に機能することが報告されているので [5]、c-di-GMP の合成酵素であるジグアニル酸シクラーゼ (diguanylate cyclase : Dgc) A または B との関連を調べたところ、DgcB 欠損株 ($\Delta dgcB$) では細胞接着時およびマウス感染時に Bpr4 の発現量が増加しなかった (図 2c)。これらの結果より、c-di-GMP 依存的な RisK/RisA システムにより Bpr4 の発現が制御されていることが明らかとなった。

Bpr4 の発現増加に関与する細菌側の因子をさらに探索するために、*bpr4* プロモーターの下流に *gfp* 遺伝子を挿入したプラスミド (*Pbpr4-gfp*) と百日咳菌のトランスポゾン変異体ライブラリー 800 株を組み合わせたレポーター解析を実施した。これらの変異株を Calu-3 細胞に感染させ、GFP の蛍光強度を指標に *Pbpr4* のプロモーター活性を測定したところ、細胞に接着しても GFP の発現が増大しない株を発見した。ゲノム解析の結果、この株では、*flaA* 遺伝子にトランスポゾンが挿入されていた。新たに作製した FliC 欠損株 ($\Delta flaA$) では、細胞接着時およびマウス感染時に Bpr4 の発現増加が誘導されなかった (図 2d)。*flaA* は、百日咳菌のべん毛の成分であるフラジェリンを構成する FliC タンパク質をコードする遺伝子である。百日咳菌のべん毛を構成する約 40 のタンパク質には、固定子 (MotAB) が含まれている。固定子はプロトンチャネルとして機能することでべん毛の回転運動に関与しているが、べん毛の本体から遊離した固定子は、細胞内膜に局在する Dgc と結合することで、c-di-GMP の合成を促すことが知られている [6]。そこで、MotAB と Bpr4 発現増加の関連を調べた結果、*MotA* ($\Delta motA$) 欠損株では細胞接着時およびマウス感染時に Bpr4 の発現量が増加しなかった (図 2e)。したがって、べん毛の成分であるフラジェリンと *MotA* も Bpr4 の発現増加に必須の因子であることが分かった。

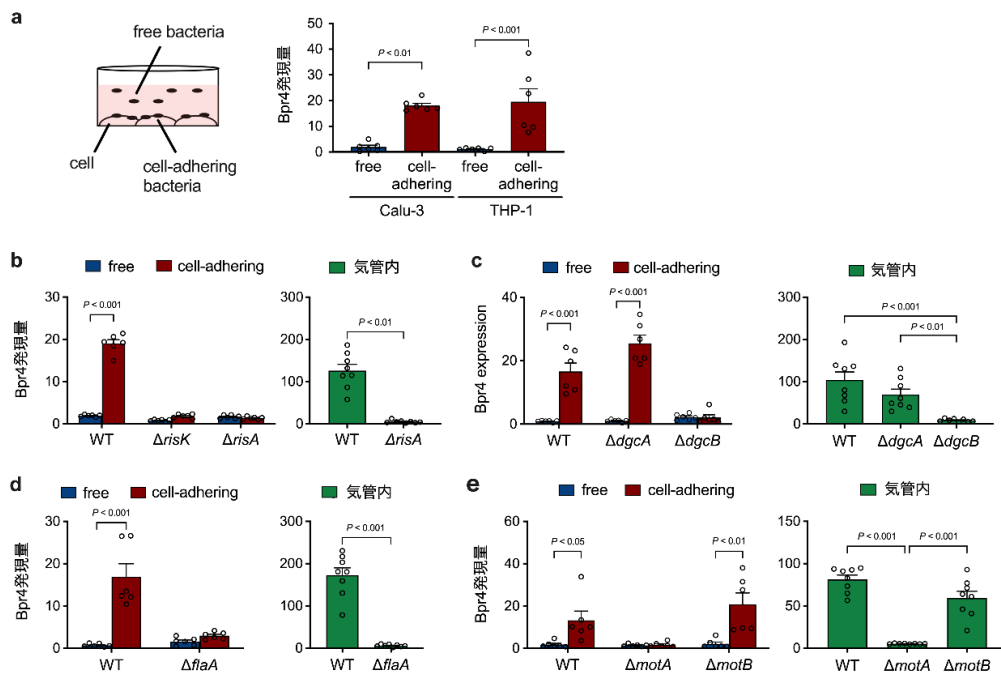


図 2. べん毛および RisK/RisA 二成分制御系を介した Bpr4 発現の亢進

- a) 百日咳菌を培養細胞 (Calu-3、THP-1) に感染させ、細胞に接着した菌 (cell-adhering) と浮遊した菌 (free) の Bpr4 発現量を測定した。
- b~e) 百日咳菌変異株を Calu-3 細胞およびマウスに感染させ、細胞に接着した菌およびマウス気管に定着した菌における Bpr4 の発現量を測定した。結果は、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて解析し (内標準: *recA* 遺伝子)、百日咳菌を SS 培地中で培養した場合の Bpr4 の発現量との比として表している。統計解析には、対応のない t 検定 (a、b、c 左図、d、e 左図) または One-way ANOVA および Tukey の多重比較法 (c 右図、e 右図) を使用した。

3. Bpr4の発現量が増加するメカニズム：宿主因子の同定

Bpr4の発現増加にフラジェリンが関与していたことから、その受容体であるToll様受容体(Toll-like receptor: TLR) 5との関連を疑ったが、*TLR5*欠損 Calu-3細胞に接着した百日咳菌でもBpr4の発現増加が見られたことから、他の宿主因子を探索することとした。細菌のフラジェリンが結合するTLR5以外の宿主因子として、ガングリオシドが多く報告されているので[7]、ガングリオシド合成阻害剤であるPPMPを処置したCalu-3細胞を用いて百日咳菌の感染実験を行ったところ、PPMP処置細胞に接着した菌ではBpr4の発現増加が抑制されていた(図3a)。また、ガングリオシドが豊富に存在する宿主細胞膜上の脂質ラフトを破壊するメチルβシクロデキストリン(MβCD)の存在下でも、同様に、Bpr4の発現増加は抑制された(図3b)。次に、百日咳菌が直接ガングリオシドを感知しているのか調べるために、プラスチックプレートに接着した菌(plate-adhering)と浮遊した菌(free)がいる状態でガングリオシドを添加したところ、プレートに接着しており、かつガングリオシドが存在している場合のみ、Bpr4の発現増加が誘導された(図3c)。また、あらかじめ菌体を固定化するための抗FHA抗体とガングリオシド(もしくは抗フラジェリン抗体)をコーティングしたプレートを準備し、百日咳菌を添加した結果、抗FHA抗体とガングリオシドの両方でコーティングしたプレートに接着した菌では、Bpr4の発現増加が確認できた(図3d)。さらに、ガングリオシドを抗フラジェリン抗体に代えた場合でも同様の結果が得られた(図3e)。これらの結果より、百日咳菌の菌体とべん毛が同時に固定され、べん毛の回転運動が阻害されることで、Bpr4の発現増加に繋がるシステムが作動することが示唆された。

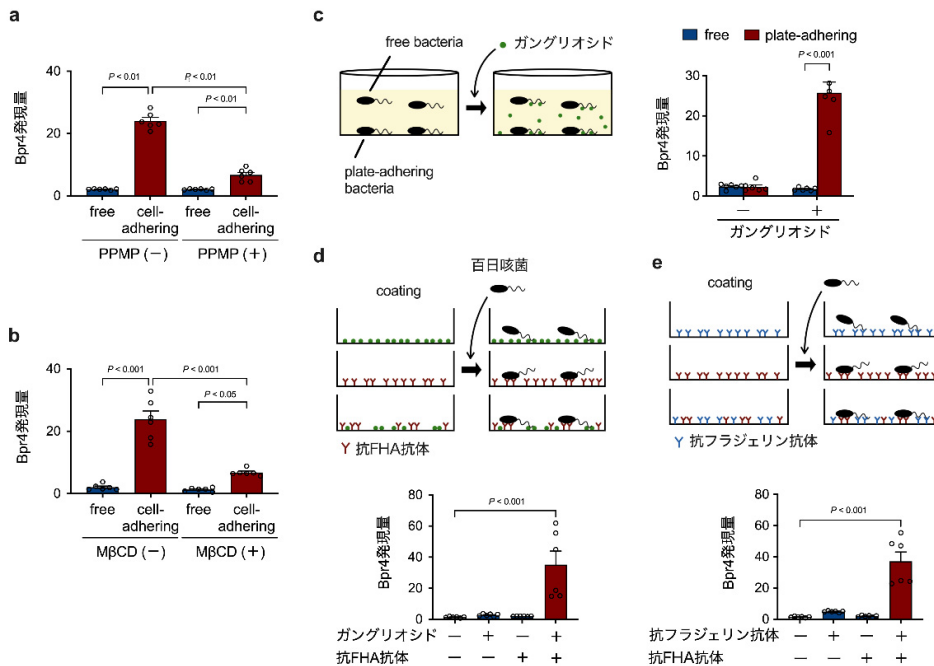


図3. べん毛とガングリオシドの結合によって作動するBpr4発現増加シグナル伝達経路

- PPMP および MβCD を処置した Calu-3 細胞に百日咳菌を感染させ、細胞に接着した菌 (cell-adhering) と浮遊した菌 (free) の Bpr4 発現量を測定した。
- プラスチックプレートに接着した百日咳菌 (plate-adhering) および浮遊菌が存在する状態でガングリオシドを添加し、Bpr4 の発現量を測定した。
- ガングリオシド、抗FHA抗体または抗フラジェリン抗体をコーティングしたELISAプレートに百日咳菌を添加し、Bpr4の発現量を測定した。結果は、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて解析し(内標準: *recA* 遺伝子)、百日咳菌をSS培地中で培養した場合のBpr4の発現量との比として表している。統計解析には、One-way ANOVA および Tukey の多重比較法 (a, b, d, e) または対応のない t 検定 (c) を使用した。

考 察

本研究において、百日咳菌は下記のシグナル伝達経路を介して Bpr4 と FHA の発現量を増大させ、宿主への感染を促進させていることを明らかにした [4]。(1) 百日咳菌のフラジェリンが宿主細胞膜上のガングリオシドと結合することで、べん毛の回転運動が停止する。(2) MotAB がべん毛本体から離れて細胞内膜に拡散される。

(3) MotA は細胞内膜に局在する DgcB に結合してこれを活性化し、c-di-GMP の合成を亢進させる。(4) c-di-GMP 依存的に機能する RisK/RisA 二成分制御系を介して Bpr4 の発現量が増加する。(5) Bpr4 が *fhaB* 5'-UTR に結合し、RNaseE による *fhaB* mRNA の分解を抑制することで FHA の発現量を増大させる。本成果により、べん毛を介した宿主感知・病原性発現制御機構が明らかとなったことで、べん毛による宿主感知を標的とした百日咳菌の新たな感染制御法の開発に繋がることが期待される。また、今回同定したシグナル伝達システムに含まれる因子 (フラジェリン、MotA、Dgc、c-di-GMP) は多くのべん毛産生病原細菌が共通して産生する分子であることから、百日咳菌だけではなく、様々な細菌感染症対策に役立つ可能性が考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究は、大阪大学微生物病研究所分子細菌学分野の西田隆司助教、Dendi Krisna Nugraha 特任研究員、堀口安彦教授、京都府立大学大学院生命環境科学研究科食環境安全性学研究室の岡真優子准教授、電気通信大学基盤理工学専攻化学生命工学プログラムの中根大介助教、大阪大学大学院理学研究科高分子構造科学研究室の今田勝己教授の協力のもと実施した。

文 献

- 1) van Beek LF, de Gouw D, Eleveld MJ, Bootsma HJ, de Jongue MI, Mooi FR, Zomer A, Diavatopoulos DA. Adaptation of *Bordetella pertussis* to the respiratory tract. *J Infect Dis*. 2018 May 25;217(12):1987-1996. PMID: 29528444 DOI: 10.1093/infdis/jiy125.
- 2) Wong TY, Hall JM, Nowak ES, Boehm DT, Gonyar LA, Hewlett EL, Eby JC, Barbier M, Damron FH. Analysis of the *in vivo* transcriptome of *Bordetella pertussis* during infection of mice. *mSphere*. 2019 Apr 17;4(2):e00154-19. PMID: 30996109 DOI: 10.1128/mSphereDirect.00154-19.
- 3) Hiramatsu Y, Suzuki K, Motooka D, Nakamura S, Horiguchi Y. Expression of small RNAs of *Bordetella pertussis* colonizing murine tracheas. *Microbiol Immunol*. 2020 Jun;64(6):469-475. Epub 2020 May 13. PMID: 32227523 DOI: 10.1111/1348-0421.12791.
- 4) Hiramatsu Y, Nishida T, Nugraha DK, Osada-Oka M, Nakane D, Imada K, Horiguchi Y. Interference of flagellar rotation up-regulates the expression of small RNA contributing to *Bordetella pertussis* infection. *Sci Adv*. 2022 Dec 21;8(51):eade8971. Epub 2022 Dec 21. PMID: 36542710 DOI: 10.1126/sciadv.ade8971.
- 5) Coutte L, Huot L, Antoine R, Slupek S, Merkel TJ, Chen Q, Stibitz S, Hot D, Locht C. The multifaced RisA regulon of *Bordetella pertussis*. *Sci Rep*. 2016 Sep 13;6:32774. PMID: 27620673 DOI: 10.1038/srep32774.
- 6) Baker AE, Webster SS, Diepold A, Kuchma SL, Bordeleau E, Armitage JP, O'Toole GA. Flagellar stators stimulate c-di-GMP production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2019 Aug 22;201(18):e00741-18. Print 2019 Sep 15. PMID: 30642992 DOI: 10.1128/JB.00741-18.
- 7) Haiko J, Westerlund-Wikström. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)*. 2013 Oct 25;2(4):1242-37. PMID: 24833223 DOI: 10.3390/biology2041242.