

宿主感染時に高発現する small RNA を介した百日咳菌の病原性発現制御機構の解析

大阪大学微生物病研究所 助教

平松 征洋

背景・目的

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、これらの病原因子の発現は、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。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。*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見出した。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た。

助成期間の成果

宿主感染時に発現量が増加する 4 種類の sRNA (Bpr4, 5, 8, 9) に着目し、百日咳菌のマウスへの感染能にこれらの sRNA が与える影響を調べたところ、Bpr4 欠損株では気管への定着率の有意な低下が見られた。さらに解析を進めたところ、Bpr4 は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) をコードする *fhaB* mRNA の 5'非翻訳領域 (UTR) に RNA シャペロンである Hfq の存在下で結合し、RNaseE による *fhaB* mRNA の分解を抑制することで、FHA の発現量を転写後レベルで増加させ、百日咳菌の宿主への感染を促すことが明らかとなった。Bpr4 が百日咳菌の宿主への感染に関与することが分かったので、次に、Bpr4 の発現量が宿主感染時に増加するメカニズムを検討した。私たちはこれまでに、マウス感染時に Bpr4 の発現量が増大することを見出していたので、この現象が培養細胞に接着した百日咳菌でも見られるか確かめたところ、Calu-3 細胞お

よびマクロファージに分化させた THP-1 細胞に接着した百日咳菌でも、Bpr4 の発現増加が見られた。この結果より、百日咳菌は宿主細胞表面上の因子を認識することで Bpr4 の発現量を増加させていることが示唆された。この Bpr4 の発現増加に繋がるシグナル伝達システムについて、まずは関与する菌側の因子を同定するために、種々の百日咳菌変異株およびトランスポゾン変異体ライブラリーなどを用いた解析を行ったところ、Bpr4 の発現増加は以下のシグナル伝達経路を介して誘導されていた。(1) ベン毛の成分であるフラジェリンが宿主因子を感知すると、ベン毛の固定子 (MotAB) がベン毛複合体から離れて百日咳菌の細胞内膜上で拡散する。(2) MotA は細胞内膜に局在するジグアニル酸シクラーゼ B (DcgB) に結合してこれを活性化し、cyclic di-GMP の合成を亢進させる。(3) cyclic di-GMP 依存的に機能する Risk/RisA 二成分制御系を介して Bpr4 の発現量が增加する。

Bpr4 の発現増加に関与する菌側の因子としてフラジェリンが同定されたので、フラジェリンと結合する宿主側の因子を探索したところ、宿主細胞膜の脂質ラフトに存在するガングリオシドを感知することで Bpr4 の発現量を増加させていることが分かった。百日咳菌がどのようにしてガングリオシドを感知するか詳細に調べたところ、百日咳菌の菌体が宿主細胞に接着すると同時に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ベン毛の回転運動が阻害され、その結果として上述の MotA の細胞内膜上への拡散が誘導されていることが明らかとなった。

考察・今後の見通し

本研究において私たちは、百日咳菌が宿主感染時にべん毛を介して宿主細胞 (ガングリオシド) を感知することで、Bpr4 および FHA の発現量を増加させ、宿主への感染を促進させていることを明らかにした (図 1) (Hiramatsu et al., Sci Adv. 2022)。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。一方、本研究では、百日咳菌が恒常的にべん毛を産生しているわけではなく、宿主内においてアルブミンを感知することでべん毛産生を促進することを見出している。今後、百日咳菌のアルブミン感知システムについても明らかにすることで、本菌の宿主感知および病原因子発現制御機構の全容解明を目指したい。

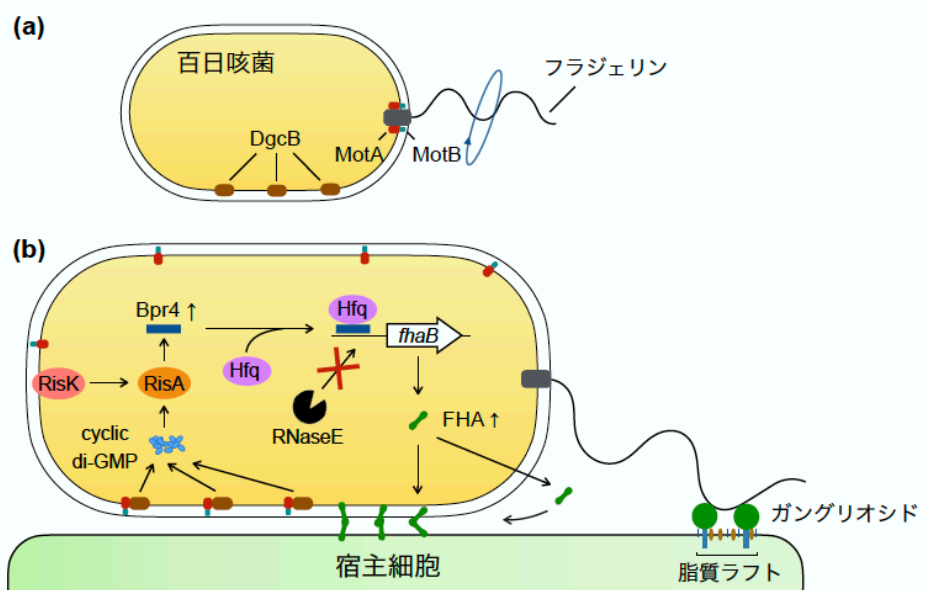


図1. 宿主細胞に接着した百日咳菌におけるBpr4とFHAの発現増加メカニズム

- (a) 正常に回転しているべん毛では、MotABはべん毛複合体に組み込まれている。
- (b) フラジェリンがガングリオシドと結合することでBpr4の発現亢進に繋がるシグナル伝達システムが作動し、百日咳菌の宿主内での定着が増強される。