

平成 31 年 4 月 28 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08786

研究課題名(和文)分泌型の制御因子BspRの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the Bordetella secreted regulator BspR

研究代表者

阿部 章夫(Abe, Akio)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号：50184205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳菌ならびに気管支敗血症菌は、III型分泌装置を介してエフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞内に注入する。エフェクターはこれら細菌の肺内定着に関与することが明らかになっているが、エフェクター分泌の調節機構については不明な部分が多い。

本研究の目的は、ボルデテラ属細菌におけるIII型分泌装置の分泌制御の仕組みを明らかにすることである。研究の結果、III型分泌タンパク質の分泌は、BspRによって負の制御を、一方、Bcr4によって正の制御を受けていることを明らかにした。また、III型分泌装置のゲートが閉じたときに、BspRによる負の制御が増強されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

百日咳は百日咳菌によって惹起される呼吸器感染症であり、ワクチンによって予防可能な疾患である。しかしその一方で、ワクチン耐性株の出現や咳発作に有効な薬剤開発はなされていないのが現状である。百日咳菌の宿主への定着には、III型分泌装置によって宿主に移行するエフェクターが関与している。III型分泌装置の制御機構を明らかにすることで、百日咳における新たな制御機構、新たな薬剤標的の発見に繋がる可能性がある。本研究では、百日咳菌のIII型分泌装置を負に制御するBspR、正に制御するBcr4について着目して研究を行うことで、本菌のIII型分泌装置における制御機構の詳細を調べようとするものである。

研究成果の概要(英文)：Bordetella species including *B. pertussis* and *B. bronchiseptica* deliver virulence factors (effectors) into host cells via type III secretion system (T3SS), and delivered effectors are involved in the long term colonization in the infected lung. However, the regulatory mechanism of the effector delivery remains to be elucidated.

The aim of this study is to understand the regulatory mechanism of the Bordetella T3SS. We demonstrate that the secretion of the type III secreted proteins is negatively and positively regulated by BspR and Bcr4, respectively. Furthermore, we reveal that the negative regulation of BspR is facilitated by when the gate of T3SS was closed.

研究分野：細菌学

キーワード：ボルデテラ属細菌 百日咳菌 気管支敗血症菌 III型分泌装置 エフェクター BspR Bcr4

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

百日咳はワクチンで予防可能な疾患であるが、近年、ワクチン耐性株が出現しつつあり、また、咳発作に著効を示す薬剤も開発されていないのが現状である。百日咳は百日咳菌によって惹起される呼吸器感染症であるが、マウスに感染が成立しないのでその類縁菌である気管支敗血症菌を用いての病原性解析が行われている。

百日咳菌ならびに気管支敗血症菌は、III型分泌装置を利用してエフェクターと呼ばれる病原因子を細胞に移行させることで、気道・肺での長期定着を確立している。すなわち、エフェクターの作用を解析することで、これら細菌の定着メカニズムが明らかになると考えられる。これまでに宿主細胞に移行する因子として、**BteA**、**BopN**、**BspR** を同定してきた。**BteA** はマクロファージに細胞傷害を誘導することで貪食回避に寄与する、また、**BopN** は **IL-10** 産生を増強させることで好中球浸潤を抑制するエフェクターであることを、それぞれ明らかにしてきた。その一方で、**BspR** は III 型分泌装置を介して宿主細胞に移行する能力のほかに、菌体内で III 型分泌装置の負の制御因子として働いている。このように **BspR** は、原核・真核生物の両方で機能しうる興味深い性質を有することを明らかにしてきた。

研究の開始当初は、様々な変異や欠失を有する *bspR* 遺伝子を発現するプラスミドを **BspR** 欠損株に導入した菌株を用い感染実験を行うことで、細胞内での **BspR** の性質を調べる予定であった。しかしマルチコピーで **BspR** を発現させると、III 型分泌装置の発現が強く抑制されてしまい実験に支障をきたすことが判明した。そこで、これらの問題を解決するためには菌体内における **BspR** の性質を理解することが重要であると考えて、**BspR** を介した III 型分泌装置の制御機構について研究をシフトした。

2. 研究の目的

本研究はユニークな作用を有する **BspR** の機能を解析することで、原核・真核生物で機能しうる新たな病原因子の性質を明らかにすることを目的としている。**BspR** ホモログはアクロモバクター属細菌でしか見つからず、なぜ、**BspR** は非常に限局された菌属においてのみ保存されているのか、また、ボルデテラ属細菌の感染形態に **BspR** はどのような影響をおよぼしているのかについても興味がある。本研究の目的は、III 型分泌装置における負の制御因子 **BspR** と正の制御因子 **Bcr4** を解明することで、気道ならびに肺内環境でボルデテラ属細菌がどのようなタイミングでエフェクターを行使するのかを知る手がかりを掴むことにある。ボルデテラ属細菌の III 型分泌装置における制御の仕組みが明らかになることで、新たな標的を指向した薬剤開発の基盤形成に繋がると考えられる。

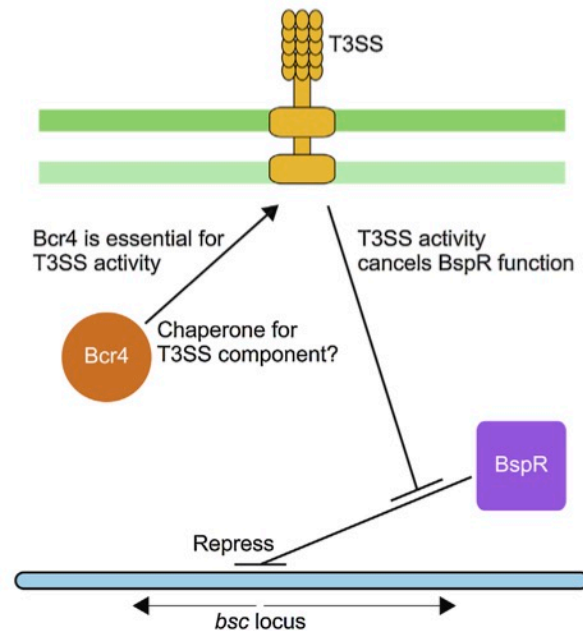
3. 研究の方法

- (1) 欠損株の性状解析： **Bcr4**、**BscN** (T3SS 基部の ATPase)、**BspR** の欠損株、ならびにこれらの二重欠損株を作製し、III 型分泌タンパク質の菌体内ならびに菌体外の量をクマシー染色、ウエスタン法にて精査する。また、欠損株ならびに相補株から全 RNA を調整し、qRT-PCR にて mRNA の定量を行う。
- (2) **Bcr4** と相互作用する因子の解析： *bcr4* 下流にある遺伝子のクローニングを行い C 末端に V5 エピトープが付加される発現ベクターにクローニングを行う。それらが発現している大腸菌の菌体粗抽出液を用いて、精製 **Bcr4**-His タンパク質を用いてプルダウンアッセイを行う。
- (3) **BopN** の宿主移行能の解析： **BopN** の宿主細胞移行能を確認するために、**BopN** の C 末端側にアデニレートシクラーゼ (**CyaA**) を付加した **BopN**-**CyaA** を作製し、**BopN** の菌体外分泌ならびに宿主移行に必要な領域を同定した。

4. 研究成果

- (1) ボルデテラ属細菌における III 型分泌装置の制御について： これまでの研究で、**BspR** は III 型分泌装置を転写レベルで負に制御することを明らかにしている。我々は III 型分泌装置構成タンパク質をコードする遺伝子の近傍に位置している *bcr4* 遺伝子に着目し、その欠損株を作製した。その結果、**Bcr4** の欠損にて III 型分泌タンパク質の菌体外分泌がストップしたことから、**Bcr4** は菌体外分泌に必要な因子であることを明らかにした。興味深いことに、**Bcr4** 欠損株では、T3SS (**BscN**) 欠損株と同様に、III 型分泌タンパク質の発現を転写レベルで抑制することを明らかにした。そこで、**Bcr4**/**BspR** の 2 重欠損株を用いて同様の解析をしたところ、III 型分泌タンパク質の菌体内での産生が認められた。以上のこと

から、III 型分泌装置が閉じたときに、BspR の作用が増強されることを明らかにした。これについては、負の制御因子である BspR (III 型分泌装置を介して菌体外分泌される) が菌体内に蓄積されることで BspR の作用が増強されると推察したが、Bcr4 ならびに BscN 欠損株(いずれも III 型分泌装置が閉じた状態となる欠損株)において、BspR の菌体内量は野生株と比べて同程度であった。これについては、BspR の菌体内局在が欠損株で変化するという仮説を立てて、各種欠損株における BspR の局在(細胞質、膜画分)を精査する予定である。



- (2) Bcr4 は III 型分泌装置構成タンパク質のシャペロンとして機能する：

Bcr4 はシャペロン様タンパク質であり、その遺伝子は構成タンパク質をコードする *bsc* 遺伝子上流に位置している。Bcr4 がシャペロンであるならば分泌装置の制御にどのような役割を果たしているのか興味を抱いた。Bcr4-His タンパク質を用いてプルダウンアッセイを行ったところ、Bcr4 は遺伝的に下流に位置する *bscX* 遺伝子産物と相互作用することを明らかにした。これらの結果より、Bcr4 を介して III 型分泌装置構成タンパク質の品質管理が行われ、また、詳細は不明であるが、III 型分泌装置のゲートが閉じたときに BspR の機能が増強されることを明らかにした(イラスト：Microbiology and Immunology, 62, 743-754, 2018. より転載引用)。今後は、BscX 欠損株を作製し、III 型分泌タンパク質の菌体内ならびに菌体外の量を精査することで、Bcr4-BscX 相互作用における III 型分泌装置のゲート機構の詳細を明らかにする予定である。

- (3) BopN は N 末端側の配列を介して宿主細胞に移行する： これまで BteA ならびに BspR の宿主細胞内移行について明らかにしてきたが、BopN についてもアデニレートシクラーゼを用いた細胞内移行の評価を行った。その結果、BopN の N 末端の 20 アミノ酸残基に菌体外移行に必要な配列があることを確認した。一方、BopN の細胞内移行には N 末端側の 200 アミノ酸残基が必要であることが明らかとなり、また、N 末端側 6-50 残基の欠失で細胞内移行能が消失した。これらの結果より、BopN の N 末端側に細胞内移行に必要なドメインが存在することが示唆された。先に報告したエフェクター BteA の細胞内移行ドメインは、N 末端側の 48 アミノ酸残基に存在していたことから、エフェクターの細胞内移行ドメインは同一菌種においても保存されていないことを明らかにした。
- (4) BopN は BteA の細胞傷害活性を増強する： これまで、エフェクター BteA は動物培養細胞に顕著な細胞傷害活性を有することを明らかにしてきた。今回の研究で、BopN は BteA の細胞傷害活性を補助的に増強することを明らかにした。今後は、BopN による BteA の増強作用について、BopN-BteA の相互作用も含めて詳細に検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Cameron S. Runte, Umang Jain, Landon J. Getz, Sabrina Secord, Asaomi Kuwae, Akio Abe, Jason J. LeBlanc, Andrew W. Stadnyk, James B. Kaper, Anne-Marie Hansen and Nikhil A. Thomas, Tandem tyrosine phosphosites in the enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone CesT are required for differential type III effector translocation and virulence, *Molecular Microbiology*, 108, 536-550, 2018. 査読あり
doi: 10.1111/mmi.13948
- (2) Ryutaro Nishimura, Akio Abe, Yusuke Sakuma, and Asaomi Kuwae, *Bordetella bronchiseptica* Bcr4 antagonizes the negative regulatory function of BspR via its role in type III secretion, *Microbiology and Immunology*, 62, 743-754, 2018. 査読あり
<https://doi.org/10.1111/1348-0421.12659>

- (3) Akio Abe, Ryutaro Nishimura and Asaomi Kuwae, *Bordetella* effector BopN is translocated into host cells via its N-terminal residues, *Microbiol Immunol* 61(6): 206-214, 2017, 査読あり
doi: 10.1111/1348-0421.12489

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Akio Abe, A small-molecule inhibitor of the bacterial type III secretion system, Indo-Japan Conference on epigenetics and disease, 2018 年
- (2) 桑江朝臣, 阿部章夫, *Bordetella* 属菌が産生する BspR と Bcr4 による III 型分泌機構の制御, 第 161 回日本獣医学会学術集会, 2018 年
- (3) 西村隆太郎, 桑江朝臣, 阿部章夫, 百日咳菌が産生するタンパク質 Bcr4 の機能解析, 第 91 回日本細菌学会総会, 2018 年
- (4) 後藤雅貴, 桑江朝臣, 阿部章夫, 百日咳菌における III 型分泌タンパク質の産生条件の検討, 第 91 回日本細菌学会総会, 2018
- (5) Asaomi Kuwae, Akio Abe, *Bordetella* effector BopN is translocated into host cells via its N-terminal residues, 第 91 回日本細菌学会総会, 2018
- (6) 西村隆太郎, 桑江朝臣, 阿部章夫, *Bordetella* 属細菌が産生するタンパク質 Bcr4 の機能解析, 第 90 回日本細菌学会総会, 2017
- (7) 桑江朝臣, 西村隆太郎, 阿部章夫, ボルデテラ属細菌の III 型エフェクターBopN の分泌シグナルの解析, 第 90 回日本細菌学会総会, 2017

[図書] (計 1 件)

- (1) オートファジー「分子メカニズムの理解から病態の解明まで」監修:大隅良典(単行本)南山堂, 2017 (12 章 ゼノファジー:病原体の排除システム 執筆者:阿部章夫)

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/view/abe-lab/>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。