

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08838

研究課題名(和文)細菌由来ネクローシス誘導因子BteAファミリータンパク質の機能解析

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of necrosis induced by BteA family proteins

研究代表者

桑江 朝臣 (Kuwa, Asaomi)

北里大学・感染制御科学府・准教授

研究者番号：60337996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳菌はBteAと呼ばれるタンパク質をヒトなどの哺乳類細胞に注入し、細胞膜の破壊を伴う細胞死を誘導する。BteAとアミノ酸配列において相同性が認められる機能未知のタンパク質がエロモナス属細菌により産生されることが強く示唆されている。これらのタンパク質は哺乳類細胞に注入された後にどのような挙動を示すことにより、細胞死を誘導するのか詳細は不明であった。本研究では、BteAと相互作用する哺乳類細胞側の因子の候補を同定し、細胞死誘導のメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

百日咳はワクチンにより予防可能な疾病の一つであるが、ワクチン接種率が高い先進国においてもなお散発的な流行が認められる。現行ワクチンの免疫持続期間が5-10年と短いこと、その結果、百日咳に罹患した軽症状の成人がワクチン未接種乳児の感染源になっていること、また百日咳の典型的な症状である咳発作に効果的な薬剤が未開発であることが問題となっている。本研究では百日咳菌に特異的な病原因子であるBteAの作用機序の解明を試み、その一端を明らかにした。本研究がさらに発展すれば、BteAの機能を特異的に抑制するための新規薬剤開発のための分子基盤が構築可能である。

研究成果の概要(英文)：BteA is one of the type III effectors secreted by *Bordetella*. BteA induces necrosis-like cell death against mammalian cells, however, the molecular mechanism of BteA-induced cell death is largely unknown. BteA shows homology against a hypothetical protein produced by *Aeromonas hydrophila*. In this study, candidates of counter partner for BteA was isolated by yeast two-hybrid system. Our results suggest actin cytoskeleton-related proteins were involved in the cell death induced by BteA.

研究分野：医科細菌学

キーワード：百日咳菌 III型分泌機構 エフェクター 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)百日咳菌を含むボルデテラ属細菌は III 型分泌機構と呼ばれる病原因子分泌装置を有しており、いくつかのタンパク質が III 型分泌装置依存的に分泌されることが明らかにされてきた。我々の研究室でも BopB, BspR, BteA といったタンパク質が III 型分泌装置依存的に分泌されることを明らかにしてきた。

(2)BteA はボルデテラ属細菌から分泌され,III 型分泌装置を通して哺乳類細胞に直接注入されるエフェクターと呼ばれるタンパク質の一つであることが明らかになった。BteA は宿主細胞内に移行した後,細胞死を誘導するが,その分子機序については不明であった。

2. 研究の目的

(1) BteA 依存的な細胞死の誘導がアクチン重合依存的に引き起こされることが強く示唆されたが,そのときに必要な宿主側のシグナル伝達経路の詳細や BteA のカウンターパートナーは不明であったため,それらの同定を試み,BteA 阻害剤のスクリーニング系を通じた新規薬剤開発の分子基盤を築くことを目的とした。

(2)一般的に III 型分泌装置から分泌されるエフェクターはシャペロン様タンパク質と相互作用することにより安定化され,菌体外に分泌される。これまでに BteA のシャペロン様タンパク質は同定されていない。BteA の安定性を低下させることを目的とした薬剤開発を視野に入れ,菌体内あるいは菌体外で BteA と相互作用する分子の探索を試みた。

3. 研究の方法

(1) BteA は 658 アミノ酸からなるタンパク質であるが BteA 全長を哺乳類細胞に産生させると,その哺乳類細胞には細胞死が誘導される。BteA は酵母に対しても毒性を示すことが明らかとなっている。そこで細胞死誘導活性を喪失した N 末端側 600 アミノ酸領域からなる BteA をプローブとして yaset two-hybrid assay を試みた。

(2)yeast two-hybrid assay の結果,BteA と相互作用することが予想されたタンパク質を大腸菌内で組換えタンパク質として精製し,また BteA も大腸菌内で組換えタンパク質として精製し,試験管内におけるプルダウンアッセイを行なうことにより,相互作用の有無を確認する。

(3)エロモナス属細菌が産生することが予想される BteA 相同性を有するタンパク質(ここでは Ahy703 と名付けた)の遺伝子をクローニングする。Ahy703 が BteA と同様に細胞死を誘導する活性を有しているか否かを解析する。

(4) BteA に対するシャペロン様タンパク質を同定するために,ボルデテラ属細菌の様々な種類の遺伝子を欠損した菌株を哺乳類細胞に感染させ,細胞死誘導活性が低下した菌株を明らかにし,その変異遺伝子が BteA と相互作用するか否かを解析する。

4. 研究成果

(1) BteA の N 末端側 600 アミノ酸領域とヒト細胞内のタンパク質の相互作用を yeast two-hybrid assay を用いて行ったところ,アクチン細胞骨格系のシグナル伝達に参与する分子が相互作用候補因子としていくつか同定された。これらの因子の mRNA より cDNA を合成し,大腸菌内で産生させるための発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターを用いて精製したタンパク質と BteA の相互作用がプルダウンアッセイにより示唆された。現在はその相互作用の特異性について解析中である。またこれらの相互作用候補タンパク質の遺伝子を欠損する哺乳類細胞を CRISPR-Cas9 系のゲノム編集技術を用いて構築している。

(2) エロモナス属細菌 *A. hydrophila* が産生する 703 アミノ酸からなる機能未知タンパク質 Ahy703 をコードする遺伝子を哺乳類細胞用発現ベクターにクローニングした。構築したプラスミドを COS-7 細胞に導入して,24 時間後に細胞外培地に遊離した乳酸脱水素酵素(LDH)の量を測定したところ,BteA と同様に細胞死誘導活性を有することが示された。BteA は N 末端側 312 アミノ酸領域と 313 番目以降の C 末端側 346 アミノ酸領域をコードする遺伝子を独立したプラスミドに挿入し,哺乳類細胞内で別々のオリゴペプチドとして産生させた場合も細胞死を誘導することが示されている。興味深いことに

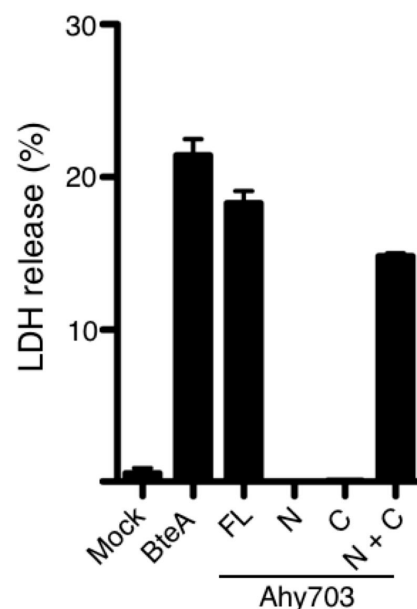


図1 Ahy703をCOS-7細胞内で産生させた場合の乳酸脱水素酵素の遊離

Ahy703 においても N 末端側 368 アミノ酸領域と 369 番目以降の C 末端側 335 アミノ酸領域を別々のプラスミドより 2 つのポリペプチドとして同一の哺乳類細胞内で産生させると細胞死が誘導された (図 1)。この結果より、BteA と Ahy703 はタンパク質全体に渡り 49% の相同性が認められるが、N 末端側領域と C 末端側領域の活性はほぼ同一であることが明らかになった。

(3) ボルデテラ属細菌である気管支敗血症菌の BopN と呼ばれるエフェクターを欠損する菌株を哺乳類細胞に感染させたところ、細胞死の誘導活性が野生株と比較して 1/3 程度に低下することが明らかとなった (図 2)。

(4) BopN を単独で哺乳類細胞内で産生させても細胞死の誘導活性が認められなかったことから、BopN は BteA の活性を補助するような機能を有していることが示唆された。BopN の部分欠失変異体を産生する BopN 欠損株を用いて、BopN 内のいずれの領域が BteA の活性を補助するために必要であるかを解析したところ BopN の N 末端側 300 アミノ酸領域中にその機能がコードされていることが示唆された。

(5) ボルデテラ属細菌において BopN をはじめとする III 型分泌タンパク質や III 型分泌装置を構成するタンパク質をコードする領域は *bsc* locus と呼ばれる。*bsc* locus 内の機能未知タンパク質をコードする *bcr4* 遺伝子を破壊した株を作製した。Bcr4 は BteA をはじめとする III 型分泌タンパク質の分泌に必須のタンパク質であり、Bcr4 欠損株は III 型分泌装置を構築する効率が低下していることが強く示唆された。興味深いことに Bcr4 を過剰産生させた菌株では BteA などの III 型分泌タンパク質の産生や分泌が亢進した (図 3)。当該研究室ではこれまでに BspR というタンパク質が *bsc* locus の遺伝子発現を抑制する因子を同定している。Bcr4 は BspR の発現抑制機能をキャンセルすることにより III 型分泌装置、およびその分泌タンパク質の産生や分泌を正に制御していることが明らかとなった。このことより、Bcr4 の機能を抑制することは BteA をはじめとする III 型分泌タンパク質の機能を抑制すると考えられ、新規薬剤のターゲットとして期待できる。

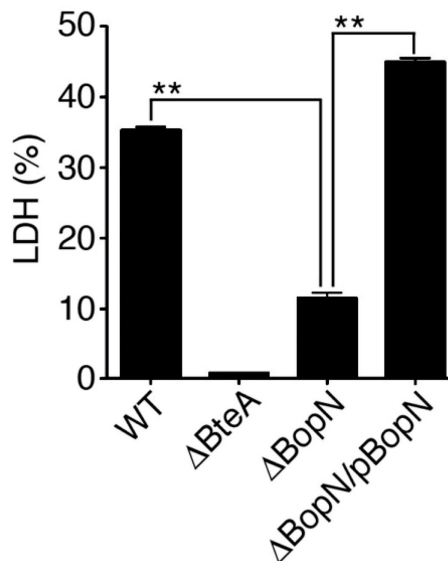


図2 BopN欠損株 (ΔBopN) を哺乳類細胞に感染させた場合のLDHの遊離量

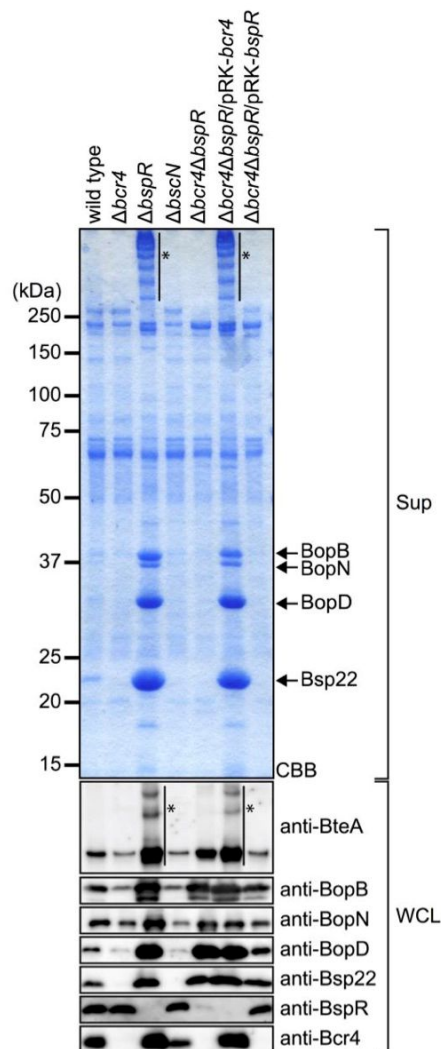


図3. Bcr4欠損株 (Δbcr4) はIII型分泌タンパク質を過剰に産生・分泌する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimura Ryutaro, Abe Akio, Sakuma Yusuke, Kuwae Asaomi	4. 巻 61
2. 論文標題 Bordetella bronchiseptica Bcr4 antagonizes the negative regulatory function of BspR via its role in type III secretion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 743-754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Abe Akio, Nishimura Ryutaro, Kuwae Asaomi	4. 巻 61
2. 論文標題 Bordetella effector BopN is translocated into host cells via its N-terminal residues	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 206 ~ 214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12489	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Runte Cameron S., Jain Umang, Getz Landon J., Secord Sabrina, Kuwae Asaomi, Abe Akio, LeBlanc Jason J., Stadyk Andrew W., Kaper James B., Hansen Anne-Marie, Thomas Nikhil A.	4. 巻 108
2. 論文標題 Tandem tyrosine phosphosites in the Enteropathogenic Escherichia coli chaperone CesT are required for differential type III effector translocation and virulence	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 536 ~ 550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mmi.13948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Ichiro, Hosomi Koji, Nagatake Takahiro, Tobou Hirokazu, Yamamoto Daiki, Hayashi Ikue, Kurashima Yosuke, Sato Shintaro, Shibata Naoko, Goto Yoshiyuki, Maruyama Fumito, Nakagawa Ichiro, Kuwae Asaomi, Abe Akio, Kunisawa Jun, Kiyono Hiroshi	4. 巻 32
2. 論文標題 Persistent colonization of non-lymphoid tissue-resident macrophages by Stenotrophomonas maltophilia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 133-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桑江朝臣
2. 発表標題 Bordetella属細菌が産生するタンパク質BspRとBcr4によるIII型分泌機構の制御
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asaomi Kuwae, Akio Abe
2. 発表標題 Bordetella effector BopN is translocated into host cells via its N-terminal residues.
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桑江朝臣, 西村隆太郎, 阿部章夫
2. 発表標題 気管支敗血症菌のBcr4はIII型分泌機構に必須なタンパク質でありBspRの機能を制御する
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤雅貴, 桑江朝臣, 阿部章夫
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下沙綾, 桑江朝臣, 阿部章夫
2. 発表標題 ボルデテラ属細菌が産生するタンパク質BopNの機能領域の解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	阿部 章夫 (Abe Akio) (50184205)	北里大学・大学院感染制御科学府・教授 (32607)	