

平成 22 年 6 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
研究期間： 2008 ～ 2009  
課題番号：20890288  
研究課題名（和文） 炭疽菌病原プラスミドにコードされる短鎖ペプチドの新規同定と感染機構の検証  
研究課題名（英文） Newly identification of virulence plasmid-encoded factor(s) secreted by *Bacillus anthracis*  
研究代表者  
坂野 聡美 （ BANNO Satomi ）  
国立感染症研究所・ゲノムセンター・研究員  
研究者番号：00513160

## 研究成果の概要（和文）：

炭疽菌 *Bacillus anthracis* は、ヒトに於いては皮膚炭疽、腸炭疽、肺炭疽を発症し、致死率の高い人獣共通感染症の病原細菌である。

炭疽病の感染・発症に関わる、炭疽菌特有の2種のプラスミド(pXO1, pXO2) 配列を解析した結果、分泌シグナル配列を持つ短鎖ペプチドおよび蛋白質をコードする ORF を複数同定した。

そこで、推定分泌因子の機能を調べるため、炭疽菌を培養した上清を培養細胞に添加し、経過観察を行った。その結果、野生株、pXO2 欠損株の培養上清を添加した場合にのみ培養細胞に形態変化が見られたことから、pXO1 に起因する形態変化であることが示唆された。また、HeLa（子宮頸ガン）細胞、vero（サル腎臓）細胞で顕著な変化が観察された一方で、形態上の変化が全く見られなかった細胞もいくつかあったことから、細胞種特異的な応答であることも明らかとなった。さらに、染色した結果、この形態変化はアポトーシスおよびアクチン重合を含めた多様な細胞応答に依るものであることが推測された。

## 研究成果の概要（英文）：

Anthrax is an infectious disease caused by gram-positive bacteria, *Bacillus anthracis*. The most important virulence-related proteins: the virulence factors (PA, EF & LF) and the capsule synthesis factors (CapBCADE) are encoded by two large unique plasmids.

First, we analyzed two large plasmid pXO1 (180kb) and pXO2 (95kb) *in silico*, we found several short ORFs with secretion signal sequence. Then, we found 23 of 204 ORFs from pXO1, and 12 of 104 ORFs from pXO2. Although signal peptidase I (SPI) is encoded by chromosome, it is especially interested that newly SPI-like protein is also encoded by pXO2.

To test the putative secreted factors, culture supernatant of various strains, WT [pXO1+pXO2+], pXO2-depleted [pXO1+], pXO1-depleted [pXO2+], and both plasmids-depleted *B.anthraxis*, were added to several cultured cells. As a result, we observed morphology change of HeLa and vero cell only treated by the culture supernatants of WT and pXO1+ strains. This morphology change of cultured cell might be attributed to pXO1. Then we tried to confirm the possibility of various cellular responses including apoptosis and actin-polymerization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	0	1,340,000
2009年度	1,200,000	0	1,200,000
年度			
総計	2,540,000	0	2,540,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：細菌学

キーワード：病原菌、培養細胞、分泌タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

炭疽菌 *Bacillus anthracis* は、ヒトに於いては皮膚炭疽、腸炭疽、肺炭疽を発症し、致死率の高い人獣共通感染症の病原細菌である。

炭疽菌のゲノム配列は、*B. cereus* (セレウス菌)、*B. thuringiensis* (卒倒病菌)と90%以上相同であり、致死性を有する炭疽菌の病原性は、2種の固有のプラスミド (pXO1、pXO2) に起因すると考えられている。感染・発症に主として貢献していると思われる炭疽菌の病原因子 (PA, EF, LF) と莢膜 (*capBCADE*)は炭疽菌固有プラスミドにコードされており、様々な研究結果がによってそのメカニズムは少しずつ解明されつつある。(図1)

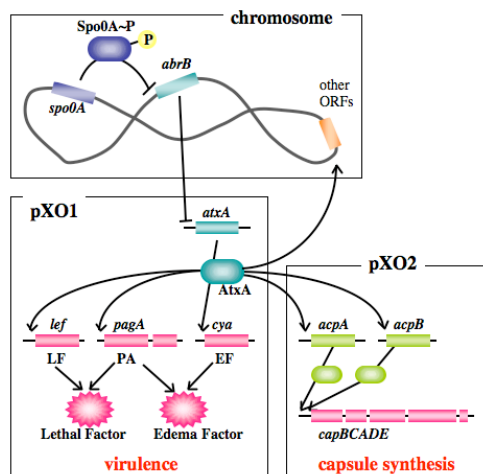


図1

しかし、その他分泌毒素の詳細に関しては報告されていない。

## 2. 研究の目的

炭疽菌固有のプラスミド pXO1 (180 kb), pXO2 (95 kb)配列を *In silico* 解析した結果、分泌シグナル配列を有する短鎖ペプチドおよび蛋白質をコードする ORF が複数見つかった。

そこで、炭疽菌を培養した上清から既知の病原因子以外で感染に関わる因子の新規同定を試み、それらの機能解析をすることによって、より詳細な感染機構を明らかにできるのではないかと考えた。

## 3. 研究の方法

(1) グラム陽性菌特有の分泌シグナル配列を SignalP プログラムで検索し、プラスミド上にコードされた推定分泌ペプチド・タンパク質の推定 ORF を抽出した。

(2) 推定分泌因子の機能を調べるため、  
・野生株[pXO1+, pXO2+]、  
・pXO2 欠損株[pXO1+]、  
・pXO1 欠損株[pXO2+]、  
・pXO1-pXO2 欠損株[no plasmid]

の4種の炭疽菌それぞれの培養上清を、HeLa (子宮頸癌)細胞、vero (サル腎臓)細胞、A549 (肺癌上皮)細胞、caco-2 (結腸癌)、HT1080 (線維肉腫)細胞の培養液に添加し、経過観察を行った。

(3) 炭疽菌培養上清を添加し、顕著な形態変化の見られた細胞 (HeLa 細胞、vero 細胞) を、Annexin V や Rhodamine-Phalloidin で染色し、細胞に何が起きているかを調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 推定分泌シグナル配列を持つ ORF を複数同定することが出来た。

病原プラスミド pXO1 上の全 204 ORFs に対して 23 の short ORF、pXO2 上の全 104 ORFs に対して 12 の short ORF を見出した。(表 4-1 : 赤丸)

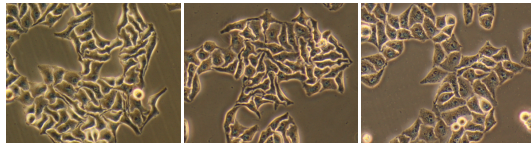
Target proteins in pXO1 and pXO2 of <i>B. anthracis</i>					
	Total ORFs	Extracellular	Membrane	Regulator	Others
pXO1	204	23 (13)	0	6	3
pXO2	104	12 (4)	3	4	0
Total	308	35 (17)	3	10	3

表 4-1

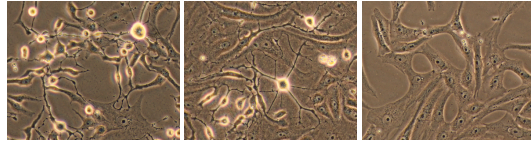
非常に興味深いことに、染色体上に signal peptidase I (SPI) を持っているにもかかわらず、pXO2 上にも signal peptidase I (SPI) 類似の新規蛋白質がコードされていることを見出した。(表 4-1 : 青丸)

(2)

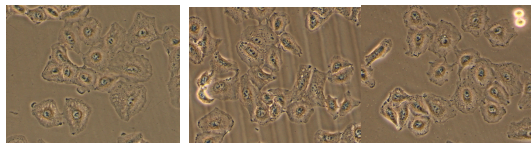
HeLa 細胞 (上清添加後 ~15h)



vero 細胞 (上清添加後 ~10h)



A549 細胞 (上清添加後 ~15h)



野生株

pXO1

No plasmids

図 4-2

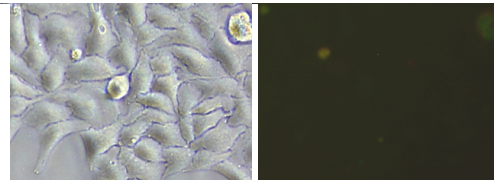
炭疽菌を培養した上清を培養細胞に添加し、経過観察を行った結果、野生株、pXO2 欠損株の培養上清を添加した場合にのみ細胞に形態変化が見られ、pXO1 に起因する形態変化であることが示唆された。(図 4-2 : 上段・中段)

特に vero 細胞においては、5 時間あまりで形態が繊維状になるという顕著な変化が見られた。

その一方で、他の細胞 (A549, caco-2, HT1080 等) ではその形態に顕著な変化が見られなかったことから、細胞形態の変化は HeLa・vero 細胞特異的に起こる現象である可能性が示唆された。(図 4-2 : 下段)

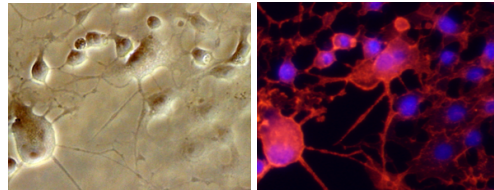
(3) AnnexinV を用いた染色により、この形態変化はネクローシスではないことが明らかとなり (図 4-3 : 上段)、アポトーシスおよびアクチン重合を含めた多様な細胞応答による形態変化である可能性が考えられた (図 4-3 : 下段)。

HeLa 細胞 (上清添加 ~15hr)



AnnexinV-alexa568 染色

vero cell (上清添加後 ~6h)



Phalloidin, DAPI 染色

図 4-3

## 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

[発表者] 坂野 聡美、  
[演題] 炭疽菌病原プラスミドにコードされる分泌タンパク質の培養細胞への影響  
[学会] 第83回日本細菌学会総会  
[年月日] 2010年3月27日  
[場所] パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

坂野 聡美 ( BANNO Satomi )

国立感染症研究所・

ゲノムセンター・研究員

研究者番号：00513160