

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590390

研究課題名（和文） ボルデテラ属細菌のアデニル酸シクラーゼ毒素の性状解析

研究課題名（英文） Different toxic activities of adenylate cyclase toxins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*

研究代表者

神谷 重樹（KAMITANI SHIGEKI）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：60379089

研究成果の概要（和文）：ボルデテラ属細菌（百日咳菌、パラ百日咳菌、気管支敗血症菌）が産生するアデニル酸シクラーゼ毒素の菌種間の性状の違いを発見し、その違いがこの毒素の 375 番目のアミノ酸残基の違いによる標的細胞への侵入過程の違いに由来することを明らかにした。またこの毒素活性の違いがボルデテラ属細菌間の宿主への感染病態の違いに関与している可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：We found that different toxic activities of adenylate cyclase toxins (ACTs) produced by *Bordetella* species including *B. pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. bronchiseptica* come from the different activities of translocation of ACTs to the target cells. Furthermore, we showed that the different toxic activities among *Bordetella* species could be a cause of the different pathology of diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性、百日咳、細菌毒素、宿主特異性

1. 研究開始当初の背景

ボルデテラ属の病原細菌には、ヒトにのみ感染し百日咳症の原因となる百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)、ヒト及びヒツジに感染するパラ百日咳菌 (*Bordetella parapertussis*)、ブタ、イヌ、モルモットなど様々な動物種に感染する気管支敗血症菌 (*Bordetella bronchiseptica*) の 3 菌種が知られている。これらの菌のゲノム全塩基配列は既に決定され、それぞれゲノムサイズは異なるものの主要病原因子とされる繊維状赤血

球凝集素(FHA)、パータクチン(PRN)、繊毛等の定着因子、アデニル酸シクラーゼ毒素(ACT)や壊死毒(DNT)等の毒素の菌種間での相同性は極めて高く、なぜこれらの3菌種が明瞭に宿主特異性を別にするのか明らかになっていない。またこれらの3菌種はいずれもヒトに感染可能であるが、百日咳菌が咳発作のような顕著な急性の症状を示すのに対し、パラ百日咳菌では百日咳で見られるより軽度の症状を示し、気管支敗血症菌では広い宿主域を持ち持続的感染するものの多く

の宿主に対し無症候性で慢性的な症状を示すが、なぜこのような感染症状の違いが生じるかについても明らかになっていない。

一方、研究代表者らは百日咳菌由来のアデニル酸シクラーゼ毒素(ACT)にはラット肺胞上皮細胞由来の L2 細胞の形態変化を起こす活性が見られるが気管支敗血症菌由来のものでは全く認められないことを発見した。気管支敗血症菌と百日咳菌の ACT は 97.9% と高い相同性を持つが、気管支敗血症菌の ACT は N 末端側が 34 残基長く、C 末端側ヘモリンドメイン(特に RTX 領域)に 34 残基の違いがあり、この違いが百日咳菌と気管支敗血症菌の ACT の L2 細胞に対する作用の違いを規定していると思われた。

一方、ACT をコードする *cyaA* 遺伝子を欠損した百日咳菌変異株は宿主の肺に定着・増殖できないことが報告されており、ACT は百日咳菌の感染に極めて重要な役割を果たしている可能性がある。従って百日咳菌と気管支敗血症菌の *cyaA* 遺伝子をスワップした変異株を作製し、マウスやラットなど種々の動物感染モデルを用いて感染時の定着能・増殖能や致死性を解析することにより ACT の分子レベルでの違いが感染病態に反映されていることが明らかにできると考えられる。

以上のことから、遺伝学的に極めて近縁なゲノムを共有しながら感染宿主域を含めた感染病態が大きく異なる百日咳菌と気管支敗血症菌の ACT を比較解析すれば、ACT が感染病態の違いを規定する細菌側因子の 1 つとなりうると考えられ、百日咳感染病態の解析へと展開する可能性を有しており、その学術的価値は極めて高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的はボルデテラ属細菌が産生するアデニル酸シクラーゼ毒素(ACT)の性状を分子レベルで解析し、ボルデテラ属細菌間で異なる、宿主特異性を含めた感染病態の違いと本毒素との関連を解析することにある。この目的のためにボルデテラ属細菌のアデニル酸シクラーゼ毒素関連遺伝子をクローニングして、毒素の作用機序の解析を行い、本毒素の分子レベルの解析からボルデテラ属細菌の感染病態の違いにいかなる寄与があるかを解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 百日咳菌と気管支敗血症菌のアデニル酸シクラーゼ毒素遺伝子のクローニングとキメラ毒素もしくはアミノ酸置換による変異型毒素の作製と精製

百日咳菌 Tohama 株及び気管支敗血症菌 RB50 株よりアデニル酸シクラーゼ毒素関連遺伝子(*cyaA*, *cyaC*)をクローニングし、大腸菌発

現系により各 ACT を発現、陰イオンクロマトグラフィーとゲルろ過により精製した。キメラ毒素については①C 末端側ヘモリン領域を入れ替えたキメラ型組換え毒素②N 末端 43 残基を欠失した気管支敗血症菌由来組換え毒素を作製した。一方、アミノ酸置換についてはキメラ毒素の細胞毒素活性を調べた結果、活性に寄与するドメイン内で百日咳由来と気管支敗血症菌由来の ATC で相違するアミノ酸を Quick change 法を用いて置換して作製した。

(2) アデニル酸シクラーゼ毒素の毒素活性の測定

精製した毒素タンパクを用いて *in vitro* アデニル酸シクラーゼ活性を市販のキットを用いて測定した。またラット肺胞上皮細胞由来 L2 細胞やヒト単球様 THP-1 細胞を用いて各 ACT を作用させ、細胞レベルでの ACT のアデニル酸シクラーゼ活性と細胞形態変化を調べた。さらに標的細胞に毒素を作用させた後に抗 ACT 抗体を用いてフローサイトメトリーを行い、細胞への毒素の結合活性を調べた。また羊由来赤血球を用いて細胞溶解活性を調べた。

(3) 百日咳菌と気管支敗血症菌アデニル酸シクラーゼ毒素遺伝子の欠損株の作製と各菌由来の ACT のスワップによる毒素活性測定

百日咳菌と気管支敗血症菌のそれぞれについてアデニル酸シクラーゼ毒素遺伝子(*cyaA*)の欠損株を作製したのち、百日咳菌 *cyaA* 欠損株には気管支敗血症型 ACT を、気管支敗血症菌 *cyaA* 欠損株には百日咳菌型 ACT が発現するように染色体上で置換した変異株を作製し、培養上清あるいは精製毒素での細胞形態変化を調べた。

(4) 百日咳菌株の感染モデルでの病態の解析

上記の実験で作製した百日咳菌の ACT を持つ気管支敗血症菌、気管支敗血症菌の ACT を持つ百日咳菌、野生型の気管支敗血症菌株及び百日咳菌の 4 種の菌株を研究代表者らが開発した百日咳のラット感染動物モデルを用いて ACT の違いによる感染病態を調べた。実際には Wistar rat に気管支敗血症菌または百日咳菌を経鼻的に感染させ、感染病態を感染後の気道組織から回収される菌体数と咳嗽発作回数で評価した。

4. 研究成果

(1) 気管支敗血症菌と百日咳菌の産生する ACT の組換えタンパクを作製し、アデニル酸シクラー

一ゼ活性を測定したところ、*in vitro* 条件下では両毒素とも同等の酵素活性を示した。一方、ラット肺胞上皮由来 L2 細胞に各 ACT を作用させて細胞内での活性を測定した場合には、百日咳菌由来組換え ACT は酵素活性を示したものの、気管支敗血症菌由来組換え ACT は酵素活性を示さなかった。ACT は N 末端側から ACT 活性ドメイン、疎水性ドメイン、RTX ドメインの 3 つのドメインからなるが、各ドメインについて両毒素間にいくつかのアミノ酸残基の違いが存在する。この違いにより L2 細胞に対する ACT 活性の違いが生じるかどうかを明らかにするために、百日咳菌由来 ACT と気管支敗血症菌由来 ACT とのキメラ毒素を作製して L2 細胞への作用を調べたところ、百日咳菌由来 ACT の N 末端領域 (1-1, 007aa) を持つキメラ毒素は L2 細胞に作用を及ぼすのに対し、気管支敗血症菌由来 ACT の同領域を持つキメラ毒素は作用しないことがわかった。この N 末端側領域には両毒素間で 6 アミノ酸残基の違いが存在する。そこでこれらのアミノ酸を置換して L2 細胞に対する活性を調べた結果、ACT の 375 番目のアミノ酸が百日咳型の Phe では作用がみられ、気管支敗血症菌型の Ser では作用がみられないことが明らかとなった。またこの 375 番目のアミノ酸はボルデテラ属細菌の 1 つであるパラ百日咳菌では Ser であり、実際にパラ百日咳菌の ACT は L2 細胞に対する活性を示さないことを確認した。一方、この 375 番目のアミノ酸の違いは ACT の細胞への結合、アデニル酸シクラーゼ活性、細胞溶解活性のいずれにも影響を及ぼさなかったことから、標的細胞への侵入過程に重要であることが明らかになった。

次に、染色体上の ACT 遺伝子について気管支敗血症菌では 375 番目の Ser を Phe に、百日咳菌では Phe を Ser に置換した変異株をそれぞれ作製し、ACT 活性を調べたところ、百日咳菌変異株では L2 細胞に対する毒素活性が消失し、気管支敗血症菌変異株では認められた。そこで、これら変異株とその野生株を Wistar rat に経鼻的に感染させた結果、気道から回収された菌体数は両菌株間で野生型と変異型に差は認められなかったが、咳嗽発作回数については有意差は認められないが、それぞれの変異株では気管支敗血症菌で増加、百日咳菌で減少傾向であった。以上の結果より、375 番目のアミノ酸に起因する毒素作用の違いが気管支敗血症菌と百日咳菌の感染病態の違いに関与している可能性が示唆された。

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 8 件)

①Orth, J. H., Fester, I., Siebert, P., Weise, M., Lanner, U., Kamitani, S., Tachibana, T., Wilson, B. A., Schlosser, A., Horiguchi, Y., and Aktories, K. 2013. Defining the substrate specificity of *Pasteurella multocida* toxin-induced deamidation of α -subunits of heterotrimeric G proteins. *FASEB J* 27: 832-842. (査読有)
doi : 10.1096/fj.12-213900

②Matsuzawa, T., Kimb B-H., Kamitani, S., Miyake, M., and MacMicking, J. D. 2012. IFN- γ elicits macrophage autophagy via the p38 MAPK signaling pathway. *J Immunol* 189: 813-818. (査読有)
doi:10.4049/jimmunol.1102041

③Kamitani, S., Yamada, K., Yamamoto, S., Ishimoto, Y., Ono, T., Saiga, A., and Hanasaki, K. 2012. Differences Between Group X and Group V Secretory Phospholipase A2 in Lipolytic Modification of Lipoproteins. *Cell Mol Biol Lett* 17: 459-479. (査読有)
doi:10.2478/s11658-012-0019-2

④ Kamitani, S., Ao, S., Toshima, H., Tachibana, T., Hashimoto, M., Kitadokoro, K., Fukui-Miyazaki, A., Abe, H., and Horiguchi, Y. 2011. Enzymatic actions of *Pasteurella multocida* toxin detected by monoclonal antibody recognizing the deamidated alpha subunit of the heterotrimeric GTPase Gq. *FEBS J* 278: 2702-2712. (査読有)
doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08197.x

⑤Kitadokoro, K., Nishimura, K., Kamitani, S., Fukui-Miyazaki, A., Toshima, H., Abe, H., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Yamamoto, S., Karatani, H., and Horiguchi, Y. 2011. Crystal Structure of *Clostridium perfringens* enterotoxin displays features of β -pore-forming toxins. *J Biol Chem* 286: 19549-19555. (査読有)
doi:10.1074/jbc.M111.228478

⑥ Fukui-Miyazaki, A., Ohnishi, S., Kamitani, S., Abe, H., and Horiguchi, Y. 2011. *Bordetella* dermonecrotic toxin binds to target cells via the N-terminal 30 amino acids. *Microbiol Immunol* 55: 154-159. (査読有)
doi:10.1111/j.13148-0421.2010.00300.x

⑦ Fukui-Miyazaki, A., Kamitani, S., Miyake, M., and Horiguchi, Y. 2010. Association of *Bordetella* dermonecrotic toxin with the extracellular matrix. BMC microbiology 10: 247. (査読有)
doi: 10.1186/1471-2180-10-247

⑧ Kamitani, S., Kitadokoro, K, Miyazawa, M., Toshima, H., Fukui, A., Abe, H., Miyake, M., and Horiguchi, Y. 2010. Characterization of the membrane-targeting C1 domain in *Pasteurella multocida* toxin. J Biol Chem 285: 25467-25475. (査読有)
doi: 10.1074/jbc.M110.102285

[学会発表] (計9件)

①安倍裕順, 神谷重樹, 福井理, 岡田圭祐, 堀口安彦、IVET-IP法: ラット感染中の気管支敗血症菌の遺伝子発現プロファイル解析、第86回細菌学会総会、2013年3月18日~2013年03月20日、千葉・幕張メッセ国際会議場

②西川明芳, 安倍裕順, 岡田圭祐, 神谷重樹, 福井理, 堀口安彦、気管支敗血症菌の新たな病原因子、第86回細菌学会総会、2013年3月18日~2013年03月20日、千葉・幕張メッセ国際会議場

③安倍裕順, 神谷重樹, 堀口安彦, 東秀明、病原細菌の宿主特異性決定因子の解明、第1回 人獣共通感染症研究拠点シンポジウム、2012年6月14日、札幌・北海道大学

④安倍裕順, 神谷重樹, 福井理, 戸嶋ひろ野, 堀口安彦、IVET-IP system to screen *Bordetella* genes expressed in animal infection models. 第85回日本細菌学会総会、2012年3月27-29日、長崎・長崎ブリックホール/長崎新聞文化ホール

⑤戸嶋ひろ野, 福井理, 安倍裕順, 神谷重樹, 堀口安彦、Different activities of adenylate cyclase toxins of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. 第85回日本細菌学会総会、2012年3月27-29日、長崎・長崎ブリックホール/長崎新聞文化ホール

⑥安倍裕順, 神谷重樹, 福井理, 戸嶋ひろ野, 堀口安彦、感染成立過程で発現する病原細菌遺伝子の網羅的解析法の開発、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13-16日、横浜・パシフィコ横浜

⑦西村昂亮, 神谷重樹, 福井理, 戸嶋ひろ野, 安倍裕順, 鎌田洋一, 小西良子, 山本

茂貴, 柄谷肇, 堀口安彦, 北所健悟、ウェルシュ菌の産生する食中毒病原因子 CPE の構造および機能解析、第26回日本結晶学会年会、2011年11月24-25日

⑧堀口安彦, 北所健吾, 西村昂亮, 神谷重樹, 安倍裕順、THE PORE-FORMING MECHANISM OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ENTEROTOXIN TARGETING CLAUDINS, COMPONENTS OF THE TIGHT JUNCTION. 第84回日本細菌学会総会、2011年9月6-10日、札幌・札幌コンベンションセンター

⑨北所健吾, 西村昂亮, 神谷重樹, 福井理, 戸嶋ひろ野, 安倍裕順, 鎌田洋一, 小西良子, 山本茂貴, 柄谷肇, 堀口安彦、ウェルシュ菌エンテロトキシンの分子構造のβ型孔形成毒素の特徴、第58回毒素シンポジウム、2011年7月6-7日、東京・順天堂大学本郷キャンパス

[その他]

ホームページ等

http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp/2011Web/Horiguchis_Lab_top.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 重樹 (KAMITANI SHIGEKI)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号: 60379089