

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590517

研究課題名(和文)細胞表層応答による百日咳菌の病原性発現調節機構

研究課題名(英文)Regulation of pathogenicity via envelope stress response in Bordetella pertussis

研究代表者

花輪 智子 (Hanawa, Tomoko)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：80255405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳菌の細胞外アデニレートシクラーゼ毒素(ACT)濃度が細胞表層ストレス応答により上昇することを既に見出していたことから本研究ではその機構について解析した。細胞表層ストレス応答を担う E の活性化は ACT および分泌装置の発現に影響しなかったが、ACT を含む outer membrane vesicle の分泌量が増加した。この遊離様式の違いが ACT を安定化させたものと考えられた。また、E の活性化によりマクロファージ貪食率は低下した。これは ACT の貪食阻害作用による可能性が考えられた。以上の結果より E 依存の細胞表層ストレス応答は百日咳菌の病原性制御に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cell surface has an important role in the functioning of Bordetella pertussis virulence factors. We found cell-free adenylate cyclase toxin (ACT) was increased by the activation of sigma E, which is alternative sigma subunit of RNA polymerase relating to envelope stress response. In the present study, we investigated the mechanism of increase of cell-free ACT by sigma E activation. Transcriptions of the genes encoding ACT and its secretion machinery did not altered by activation of sigma E. On the other hand, production of outer membrane vesicle (OMV) including ACT was significantly increased. Different manner of release would provide the stability to ACT resulted in the increase of cell-free ACT. ACT inhibits phagocytosis by macrophages. Activation of sigma E by deletion of RseA was decreased the efficiency of phagocytosis. It is suggested that sigma E-dependent envelope stress response would be one of the regulation system of the pathogenicity of B. pertussis.

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：百日咳菌 細胞表層 ストレス応答 病原性 sigmaE

1. 研究開始当初の背景

百日咳菌の表層は病原因子の形成、分泌、修飾の場であり、病原性発現を考える上で重要な部位である。多くのグラム陰性菌では表層に生じたストレスによってペリプラスムに変性した蛋白質が形成されると、^E 依存の細胞表層ストレス応答が生じる。^E は RNA polymerase のサブユニットの一つであり、通常 anti- 因子である RseA と結合しているため不活性である。表層ストレスが生じると RseA が膜内で分解され、遊離した ^E は特異的なプロモーターに結合することで、表層ストレス応答に関する種々の遺伝子の転写が開始される。

^E 依存の細胞表層ストレス応答機構は、多くのグラム陰性菌が保持しており、サルモネラ、コレラ菌等では宿主に感染し、病原性を発現するのに不可欠であることが報告されている (Humphreys, et al., 1999, Kovacicova, et al., 2002)。

百日咳菌 Tohama I 株のゲノム配列中には ^E およびその活性を負に制御している RseA の調節因子の遺伝子のオルソログが存在しており、百日咳菌でも ^E 依存細胞表層ストレス応答が生ずるものと考えられた。しかしながら研究代表者らの知る限りでは百日咳菌の細胞表層ストレス応答に関する報告はこれまでになく、2012 年に百日咳菌と同じ *Bordetella* 属の気管支敗血症菌で報告されたのみである (Barchinger et al., 2012)。

2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでの研究において ^E 依存の表層ストレスにより百日咳菌の病原因子である百日咳菌毒素の量は減少するが、アデニレートシクラーゼ毒素 (ACT) の細胞外濃度が上昇することを見いだした。本研究課題では ^E 活性化による遊離 ACT 増加の機構について解析し、細胞表層ストレスに対する応答の病原性発現における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 転写量およびプロモーター活性の測定

qRT-PCR による mRNA 量の測定

百日咳菌の野生株および変異株の全 RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した後、目的とする蛋白質の N 末端付近をコードする領域約 100bp を増幅するようにプライマーを設計し、SYBER Green による定量 RT-PCR 法で目的遺伝子の mRNA 量を測定した。

レポーターアッセイ系による検討

目的とする遺伝子のプロモーターを含む約 250bp の DNA 断片を PCR により合成し、pMP220 プラスミド上にあるプロモーターをもたない *lacZ* 遺伝子の下流に組み込み、融合遺伝子を作成した。これらのプラスミドを百日咳菌野生株および *rseA* 欠損変異株に導入し、Miller の方法により発現した β -ガラクトシダーゼ酵素の活性を測定してプロモ

ーター活性とした (Miller, 1972)。

(2) 細胞外 ACT の局在に関する検討

細胞外 ACT 含有画分の分離

培養上清を限外ろ過膜 (Amicon® Ultra-50K, and 100K) で分画、濃縮後、超遠心により不溶性および可溶性画分に分離し、各画分中の蛋白質中の ACT をイムプロットングにより解析した。

OMV の解析

百日咳菌培養上清を上記のように分画、濃縮した後、OptiPrep®を用いた密度勾配遠心法により OMV 画分を分画し、イムプロットングのサンプルとして用いた。

(3) 抗 FHA 抗体の作成

FHA の AA 553-1084 をコードする DNA 断片を PCR で増幅し、pQE31(Qiagen)にクローニングした後、大腸菌 JM109 株を形質転換した。発現した His-Tag 融合蛋白質をアフィニティーカラムで精製後、ウサギを免疫して anti-FHA 抗体を作成した。抗体の反応性は FHA 標準品を購入しての確認を行なった。

(4) イムプロットング

抗 ACT 抗体および抗百日咳毒素抗体は SantaCruz 社より購入した。

イムプロットングは SDS-PAGE で蛋白質を展開した後、PVDF 膜に転写し、反応した抗体による ECL を用い LAS-4000(GE Healthcare) を用いて検出および定量を行なった。

(5) 培養細胞株を用いた検討

付着性およびマクロファージ貪食率の検討

野生株および *rseA* 欠損変異株を対数増殖期まで培養した後、ヒト肺上皮細胞由来細胞株 A549 およびマウスマクロファージ由来細胞株である J774.1 に添加し、1,300 rpm で 5 分間遠心後 10 分間保温した後、付着した百日咳菌の生菌数を測定した。

J774.1 マクロファージ培養細胞株を用いた検討

百日咳菌の野生株および *rseA* 欠損変異株を対数増殖期まで培養した後、J774.1 に添加し、1,300 rpm で 5 分間遠心後 1 時間保温し、細胞を洗浄後 100 μ g/mL のゲンタミシンを添加した培地を加えて 1 時間保温した後、滅菌精製水を加えて細胞を破壊し、貪食された百日咳菌の生菌数を測定した。

(6) バイオフィーム形成

バイオフィーム形成能の測定

12 穴プレートにカバーガラスを入れ、そこに菌液を入れて震盪培養することでカバーガラス表面に形成されるバイオフィームの厚さをクリスタルバイオレット法で測定した。取り込まれた色素は 15% 酢酸-エタノールで抽出し 550 nm の吸光度を測定した。

走査型電子顕微鏡 (SEM) によるバイオフィームの形態観察

形成させたバイオフィームを 2.5% グルタルアルデヒド-PBS で固定し、走査型電子顕微鏡 (JSM 6330F, JEOL Ltd.) で観察した。

4. 研究成果

当初^Eをコードする *rpoE* 遺伝子欠損変異株の作成を試みたが得られず、大腸菌同様に百日咳菌にとって必須遺伝子である可能性が考えられた。そこで、*rseA* 欠損変異株を用いて^Eが恒常的活性化した系を用いて検討を行なった。

(1) ^E活性化による *cyaA* 発現への影響

^E活性化による *cyaA* 遺伝子の転写への影響を調べる目的で *cyaA* 特異的 mRNA 量およびプロモーターの活性を比較した。その結果、*rseA* 欠損変異株の細胞内 *cyaA* 特異的 mRNA の量は野生株と有意な差がみられなかった。そこで、さらに転写に対する影響を調べる目的でプロモーター活性を *lacZ* の融合遺伝子によるレポーターアッセイにより測定した。

cyaA の下流には ACT の分泌に関ると考えられている I 型分泌装置遺伝子 *cyaBDE* がコードされており、*cyaA* オペロン内には *cyaABDE* を転写するプロモーターと *cyaBDE* を転写する2つのプロモーターが存在している。これらのプロモーターからの転写活性を測定した結果、変異株の活性は野生株と同等であった。

以上の結果は *rseA* 欠損による培養上清中 ACT 量の増加は転写量の上昇によるものではないことを示している。

(2) 培養上清中 ACT の存在様式

限外ろ過により培養上清中の蛋白質を 100 kDa で分画し、イムノプロットで抗 ACT 抗体と反応するバンドを検出したところ、野生株の培養上清には *rseA* 欠損変異株には野生株のものにはない ACT の分解物とみられる 40kDa の蛋白質が検出された(図1)。このことから変異株より分泌された ACT は野生株と異なる様式で存在している可能性が考えられた。

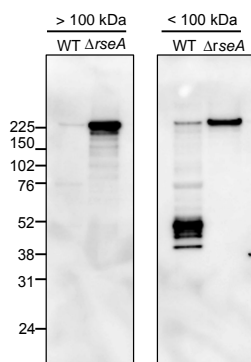


図1. 培養上清中蛋白質の抗ACT抗体を用いたイムノプロット

outer membrane vesicle(OMV)はグラム陰性菌が産生する vesicle で、外膜蛋白質の他、病原因子の輸送を担っていること、さらに細胞表面層ストレスによりその産生は増加することが報告されている(McBroom, 2007)。そこで百日咳菌の表面層を SEM で観察した結果、多数の vesicle が検出された(図2)。さらに *rseA* 欠損株が産生する OMV を分画し、イ

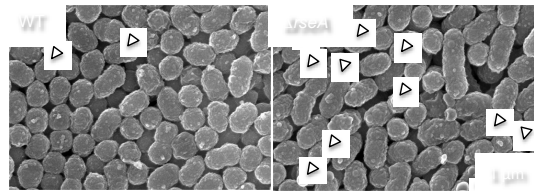


図2. 百日咳菌野生株および*rseA*欠損変異株コロニー表面層の形態

ムノプロットングを行なったと、ACT が検出された。以上の結果から ACT は OMV を介して分泌されることが明らかとなった。

(3) 細胞外 ACT と FHA との関連

ACT は I 型分泌機構により細胞外に分泌された後、多くは細胞表面層に留まるがその機構については FHA が関与しているということの他は明らかにされていない(Zaewtzky, 2002)。そこで *rseA* 欠損変異株における FHA の発現および局在について検討を行なった。その結果、ACT の結果と同様、^E活性化による発現上昇はみられないものの培養上清中の FHA 量が増加していることが明らかとなった。これらの結果は FHA が ACT の細菌表面層からの遊離と関連し、さらに安定化に関与する可能性を示唆するものである。

(4) ^E活性のバイオフィーム形成への影響

細菌のバイオフィームを構成する細胞外マトリックスの成分には多糖、DNA 等の他、OMV も含まれる(Yonezawa, et al. 2010)。*rseA* 欠損変異株のバイオフィーム形成を野生株と比較したところ、変異株は野生株より厚いバイオフィームを形成した。さらに *Ptac* プロモーターの下流に *rseA* 構造遺伝子を接続し、転写量を IPTG により制御できる系を構築し、それを用いて RseA 量が増加すると共にバイオフィーム形成能が低下することが明らかとなった(図3)。

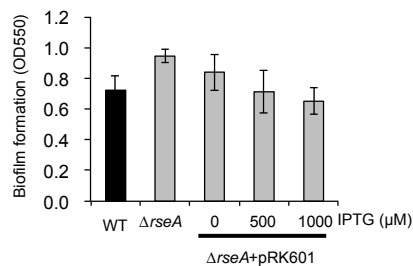


図3. バイオフィーム形成

(5) ^E活性化による上皮細胞およびマクロファージへの影響

バイオフィーム形成能はしばしば細胞への付着性との関連性がみられる。また、FHA は重要な付着因子であり、ACT も付着因子としての活性が報告されている。そこで野生株および変異株の上皮細胞への付着性をヒト肺上皮細胞株 A549 を用いて比較したが、有意な差はみられず、遊離した ACT、FHA 量の増加は上皮細胞への付着性に影響を与えないことが示唆された。一方、マウスマクロファージ様培養細胞株である J774.1 に対する

貪食率を比較したと、変異株の貪食率は約 1/10 であり、顕著に低下した。ACT は貪食阻害作用を有することから (Kamanova et al., 2008) OMV として表層に局在する ACT により貪食が阻害された可能性が考えられた。

百日咳菌の病原因子の発現は全て BvgAS 二成分制御系によって正に制御されており、宿主内で発現するとされてきた。しかしながら宿主内の微小環境は宿主側の防御因子や病態により変化に富んだものであり、BvgAS のみで制御されているとは考えにくい。本研究では発現した ACT が環境に応じて遊離形式を変化させ、その活性を制御することを示唆するデータを示した。これにより従来の BvgAS の系に加えて新たな病原性発現制御機構を提示できたものとする。今後、百日咳菌の^Eレギュロンを網羅的に解析し、さらに病原性制御機構の詳細について解析を行なう予定である。

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 3 件)

Tomoko Hanawa, Hideo Yonezawa, Hayato Kawakami, Shigeru Kamiya, Sandra Armstrong: Role of *Bordetella pertussis* RseA in the cell envelope stress response and adenylate cyclase toxin release. Pathog Dis (査読有) 69:7-20, 2013. doi: 10.1111/2049-632X.12061.

Kentaro Sugisaki, Tomoko Hanawa, Hideo Yonezawa, Takako Osaki, Toshiyuki Fukutomi, Kawakami H, Tomoko Yamamoto, Shigeru Kamiya: Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. Microbiology (査読有) 159(7):1379-1389, 2013. doi: 10.1099/mic.0.066597-0.

[学会発表](計 13 件)

Tomoko Hanawa, Kentaro Sugisaki, Hideo Yonezawa, Hayato Kawakami, Shigeru Kamiya: Expression of virulence factors under nutrient-limited condition in *Bordetella pertussis*. 10th International Symposium on *Bordetella*, 8-11, September, 2013, Dublin, Ireland

杉崎健太郎, 花輪智子, 米澤英雄, 大崎敬子, 蔵田訓, 北条史, 神谷茂: 百日咳菌 (p)ppGpp 欠損株の Biofilm 形成および病原因子の発現. 第 86 回日本細菌学会総会, 平成 25 年 3 月 18-20 日、千葉

Tomoko Hanawa, Kentaro Sugisaki, Hideo Yonezawa, Hayato Kawakami, Shigeru Kamiya: Biofilm formation of *Bordetella pertussis*; response to nutritional

starvation. Biofilms 5, 10-12, December, 2012, Paris, France

Tomoko Hanawa, Kentaro Sugisaki, Hideo Yonezawa, Takako Osaki, Satoshi Kurata, Cynthia Zaman, Shigeru Kamiya: Implication of the role of stringent response in the expression of adenylate cyclase toxin in *Bordetella pertussis*. The Joint Meeting of the 17th International Symposium on Gnotobiology (ISG) and the 34th Congress of Society for Microbial Ecology and Disease 20-23, November 2011, Yokohama

Tomoko Hanawa, Hideo Yonezawa, Takako Osaki, Satoshi Kurata, Cynthia Zaman, Sandra Armstrong, and Shigeru Kamiya: Envelope stress response and secretion in *Bordetella pertussis*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6th-10th September, 2011, Sapporo.

Tomoko Hanawa, Hideo Yonezawa, Shigeru Kamiya, Sandra Armstrong: Role of^E in the envelope stress response and an implication for the production of toxins in *Bordetella pertussis*. 111th general meeting of the American Society for Microbiology, 21-24, May, 2011, New Orleans, USA

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花輪 智子 (HANAWA, Tomoko)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号: 80255405

(2) 研究分担者

神谷 茂 (KAMIYA, Shigeru)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 10177587

(3) 連携研究者

米澤 英雄 (YONEZAWA, Hideo)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号: 60453528

(4) 連携研究者

山本 友子 (YAMAMOTO, Tomoko)

千葉大学・薬学研究科・教授

研究者番号: 60110342

(5) 研究協力者

Sandra K. Armstrong

ミネソタ大学・医学研究科・教授