

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390108

研究課題名(和文)ボルデテラ属細菌のエフェクターによる樹状細胞のディレクティング

研究課題名(英文)Directing of dendritic cells by Bordetella type III effectors

## 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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳菌とその類縁菌である気管支敗血症菌は、III型分泌装置を介して宿主細胞内にエフェクターを注入することで、気道での定着を確立している。申請者らは、これまでにエフェクターBopCとBopNを同定している。エフェクターBopNは細胞の核内に移行することを見出しているが、CyaAレポーターアッセイにより、BopNの宿主細胞への移行を確認した。また、細胞内に移行したBopNはBopCと相互作用することで、BopCの細胞傷害活性を増強することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Type III secretion systems (T3SSs) are highly conserved in *Bordetella pertussis* and its related strain, *B. bronchiseptica*. This machinery delivers effectors into host cells leading to the long term colonization on trachea. Using a CyaA-mediated translocation assay, we demonstrated that BopN has an ability to translocate into the host cells. Furthermore, a pull-down assay revealed that BopN can associate with BopC. Interestingly, BopC-induced host-cell death is facilitated by the BopN localization into host cells.

研究分野：医歯薬学

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

### 1. 研究開始当初の背景

百日咳はグラム陰性桿菌の百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) によって惹起される呼吸器感染症であり、ワクチン接種率が高い北米や我が国においても、その患者数が増加しつつある。百日咳菌はヒトに対して高い宿主特異性を示すことから、百日咳菌の類縁菌である気管支敗血症菌 (*B. bronchiseptica*) を用いて *in vivo* での機能解析が行われている。申請者は、気管支敗血症菌のIII型分泌装置 (T3SS) によって宿主細胞内に注入されるエフェクターの機能について研究を展開してきた。これまでに BopC と BopN の機能を明らかにしており、前者は細胞傷害を誘導し、後者は NF- $\kappa$ B の核内移行を制御することで、IL-10 産生を誘導するエフェクターであった。これら研究の過程で、気管支敗血症菌はIII型分泌装置依存的に樹状細胞の貪食作用から回避することを見出した。本研究は気管支敗血症菌が感染細胞の機能をどのようにディレクティングするのかについて、細胞内に注入されるエフェクターの機能解析を通して明らかにするものである。

### 2. 研究の目的

1) 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 BopC と BopN を宿主細胞内に注入する。本研究は本来殺菌排除に関わる樹状細胞を、気管支敗血症菌がどのようにディレクティングするのかについて、エフェクター BopC、BopN の機能から解析するものである。本研究の進展により、百日咳菌を含むボルデテラ属細菌の感染メカニズムが解明されることで、ワクチン・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) BopN の宿主細胞移行の解析: BopN はエルシニア属細菌のIII型分泌装置の制御因子 YopN と同源性を示すことから、ボルデテラ属細菌においてもIII型分泌装置の制御に関わると推察されていた。申請者は予備的な実験にて、BopN が宿主細胞内に移行することを明らかにしている。そこで、アデニル酸シクラーゼ毒素 (CyaA) によるレポーターアッセイ系

を用いることで、BopN の宿主細胞への移行を評価することができる。CyaA は哺乳類細胞内に存在するカルモジュリンによって特異的に活性化され、それにより細胞内の cAMP 量は増大する。bspR 遺伝子下流に cyaA 遺伝子を連結した *bspR-cyaA* 融合遺伝子を含む発現ベクターを作製した。菌体内で産生された BspR-CyaA 融合タンパク質がボルデテラのIII型分泌装置を介して宿主の細胞内に移行するのなら、融合タンパク質の CyaA 活性により細胞内の cAMP が上昇する。この cAMP 量を検出することで、BspR の宿主移行能を定量的に評価するものである。

2) プルダウンアッセイ: Strep タグが付与された精製タンパク質、FLAG タグが付与された精製タンパク質溶液をタンパク質間で分子数が同じになるように調整し、2% Triton X-100/PBS (-) pH8.0 を 37.5  $\mu$ l 添加後、全量が 75  $\mu$ l になるように PBS (-) pH8.0 を加えて室温で1時間静置した。その後、Strep-tactin sepharose を添加し室温で1時間混和した後、遠心をおこなった。上清 15  $\mu$ l に 2  $\times$  SDS sample buffer 15  $\mu$ l を加え 95  $^{\circ}$ C、3分間処理したものを上清画分とした。遠心後の Strep-tactin sepharose を 1% Triton X-100/PBS (-) pH8.0 で3回洗浄後、2  $\times$  SDS sample buffer を 30  $\mu$ l 加えて 95  $^{\circ}$ C、3分間処理したものを沈殿画分とした。

### 4. 研究成果

1) BopN の宿主細胞移行の解析: これまで BopN は、他のエフェクターの分泌制御に関わると報告されてきたが、BopN 全長を用いた CyaA レポーターアッセイの結果より、III型分泌装置依存的に宿主細胞に移行することを明らかにした。また、BopN の N 末端側の 100 アミノ酸残基があればIII型分泌装置を介して菌体外に分泌されるが、細胞内へ移行する能力はなかった。エルシニア属細菌や腸管出血性大腸菌のエフェクターは、N 末端側の 10 - 30 アミノ酸残基に菌体外分泌と宿主内移行に必要なドメインが内包されている。一方、BopN の宿主細胞内移行のシグナル配列は分泌に必

要なドメインよりも広範あるいは異なった領域に分散していることが示唆された。

2) BopNとBopCとの相互作用の解析: 申請者は気管支敗血症菌が誘導する細胞傷害活性は、エフェクターBopCによって誘導されることを明らかにしている。興味深いことに、BopCが誘導する細胞傷害活性は、気管支敗血症菌野生株と比較して、BopN 欠損株において低下することを新たに発見した。そこで、BopCとBopNの相互作用を検証するためにプルダウンアッセイによる解析をおこなった。大腸菌の組み換え系で精製したStrepタグを付与したBopN (BopN-Strep)とFLAGタグを付与したBopC (BopC-FLAG)を混和して Strep-tactin sepharoseによりStrepタグをもつタンパク質を回収した。回収後のサンプルはSDS - PAGEで展開し、抗Strep抗体および抗FLAG抗体を用いてウエスタンブロットをおこなった。抗Strep抗体を用いたウエスタンブロットにおいて、BopN-Strepを含む試料は沈降画分でBopN-Strepの位置にシグナルを検出した。抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロットでは沈降画分にBopC-FLAGのシグナルが検出され、BopNとBopCは相互作用することが示唆された。BopN はIII型分泌装置を介して宿主細胞に移行した後、BopC と相互作用することで、細胞傷害活性を増強することが示唆された。BopN は IL-10 産生を増強するエフェクターとして同定してきたが、BopN と相互作用する未知エフェクターならびに宿主側因子の解析を行うことで、BopNの機能を解析していく予定である。

3) BopN ファミリーの共通した性質: エルシニア属細菌のYopNはIII型分泌装置を制御することが報告されている。興味深いことに、BopNとYopNは相同性を示しており、BopNもボルデテラ属細菌のIII型分泌装置を制御していることが推察されていた。しかし、今回の実験で、BopNはBopCと相互作用することで、BopCのもつ細胞傷害活性を増強する作用を有していた。興味深いことに、BopN 欠損株に YopN 発現ベクター導

入したところ野生株と同程度の細胞傷害性を示した。このことから、YopNはBopNと同様にBopC依存的な細胞傷害性を促進することが示唆された。おそらくエルシニア属細菌内では、YopNは他のエフェクターと相互作用することで、エフェクターの活性を調節していることが推察される。BopNはIL-10の産生を増強するエフェクターとして報告したが、BopNはBopCや他の未知エフェクターと相互作用することで、エフェクター活性を制御していることが示唆された。

## 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 1 件)

Keisuke Okada, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Akio Abe, Asaomi Kuwae, Yasuhiko Horiguchi, Hiroyuki Abe: Complete Genome Sequence of *Bordetella bronchiseptica* S798, an isolate from a pig with atrophic rhinitis, Genome Announcements (査読あり), 2: e00436-14, 2014, DOI: 10.1128/genomeA.00436-14

[学会発表](計 6 件)

阿部 章夫, Bacterial infection strategy by type III secretion system effectors, 88回日本細菌学会総会, 2015年3月26日, 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

阿部 章夫, Functional analysis of a stealth effector, BopN, in *Bordetella*, 第87回日本細菌学会総会, 2014年3月26日, タワーホール船堀(東京都江戸川区船堀)

Akio Abe, The Type III Secreted Protein, BspR, Functions as a Global Regulator in *Bordetella bronchiseptica*, 10th International Symposium on *Bordetella*, 2013年9月10日, Dublin (Ireland)

Akio Abe, A small-molecule inhibitor of the bacterial type III secretion system,

第86回日本細菌学会総会，2013年3月20日，  
幕張メッセ(千葉県千葉市)

阿部 章夫，グラム陰性菌のエフェクター  
を介した感染戦略，第47回緑膿菌感染症研究  
会，2013年2月23日，札幌医科大学(北海道札  
幌市)

Akio Abe，Bordetella immune evasion by  
type III effectors，the 34th Naito  
Confernece on Infection，Immunity and  
their Control for Health，2012年10月17日，  
CHÂTERAISÉ Gateaux Kingdom (北海道札幌市)

Akio Abe，Bordetella strategies for  
overcoming host immune responses: Toward  
the pertussis prevention，11th Korea-Japan  
International Symposium on Microbiology，  
2012年9月14日，Buyeo (Korea)

〔図書〕(計 1 件)

阿部 章夫，羊土社，もっとよくわかる！感  
染症，2014年，276ページ

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/  
bact\\_infect/welcome.html](http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/bact_infect/welcome.html)

## 6. 研究組織

### (1)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

### (2)研究分担者

桑江 朝臣 (KUWAE Asaomi)

北里大学・感染制御科学府・准教授

研究者番号： 60337996