

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790417

研究課題名 (和文) ボルデテラ属細菌の産生する壊死毒の受容体分子の同定

研究課題名 (英文) Identification of the receptor for *Bordetella* dermonecrotic toxin.

研究代表者

福井 理 (Fukui Aya)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70397743

研究成果の概要 (和文)：本研究の目的は、ボルデテラ属細菌の産生する壊死毒 Dermonecrotic toxin (DNT) の受容体の同定であった。DNT の最少結合領域を同定し、この領域の合成ペプチドをリガンドとして受容体のアフィニティー精製を試みたが、機能的な受容体の同定には至らなかった。一方その過程で、DNT が細胞外マトリクスに特異的に付着することを見出し、DNT の効果的な作用機序の存在を示唆する結果を得た。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this project was to identify a receptor for *Bordetella* dermonecrotic toxin (DNT). I have determined the minimum region of DNT for cell binding, and attempted to isolate the receptor by using the synthetic peptide corresponding to the region. The functional receptor remains unknown and further trials would be needed to identify it. While attempting to purify the receptor, I found that DNT associates with the extracellular matrix. This association may facilitate the toxin action on target cells *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ボルデテラ属細菌、細菌毒素、受容体

## 1. 研究開始当初の背景

百日咳菌に代表されるボルデテラ属細菌は、共通して致死性の高い皮膚壊死毒、DNT を産生する。遺伝子欠損変異菌株の解析から、DNT は *Bordetella bronchiseptica* の感染症で鼻甲介骨の形成不全により起こる、ブタ萎縮性鼻炎の原因因子であると報告されている。当研究室ではこれまでに、DNT が低分子量 GTP

結合タンパク質 Rho を標的とするトランスグルタミナーゼであり、酵素作用の結果、Rho を恒常的な活性化状態にすることで骨芽細胞の分化を抑制し、上記の病態を引き起こしている可能性を示してきた。さらに私たちは標的細胞への DNT の侵入機構を解析し、DNT が (1) 細胞への結合、(2) N 末端の受容体結合領域の切断、(3) 酵素活性領域を含む C 末

端側断片の解離、(4) C 末端側断片で露出した疎水領域を介した細胞膜との相互作用、の 4 つのステップを経て活性領域を細胞質へ移行させて Rho に作用することを明らかにした。しかし、上記の最初のステップである細胞への結合様式とこれに関与する受容体については現在のところ全く不明である。DNT に感受性の細胞株は極めて少ない。また感受性細胞にのみ DNT の特異的な結合がみられることから、DNT の作用は細胞特異的であり、その特異性は細胞膜上の受容体の存否に依存すると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、機能的な DNT 受容体の同定を目指す。受容体の同定に成功すれば、これまでに明らかにしてきた毒素の標的分子、機能部位、細胞内侵入機構の成果と併せて、DNT の細菌毒素としての作用機序を完全に明らかにすることができる。また、DNT 受容体のヒトおよび動物組織における発現分布を調べ、組織特異的な病態を示すボルデテラ感染症における本毒素の関与を考察する材料とする。

## 3. 研究の方法

当研究室のこれまでの成果から、DNT は N 末端から 54 個のアミノ酸を介して細胞に結合することがわかっている。この領域に GST タグを連結した融合タンパク質を用いて pull-down 法により受容体の単離を試みたが、毒素感受性の細胞でのみ検出できる分子を特定することはできなかった。非特異的な結合しか見られなかった主な理由として、(1) 本毒素が非特異的吸着を起こし易いこと、(2) 毒素の受容体への結合が弱いと予想されることが考えられた。そこで、まず(1)の問題点を改善するため、受容体への結合に必須な DNT の最小領域を決定した。毒素の N 末領域をヒト IgG の Fc セグメントに連結した融合タンパク質を作製し、全長毒素の活性に対する阻害効果を指標にして受容体への結合を検討した。次にこの領域のペプチドを合成し、これをリガンドとして受容体のアフィニティー精製を行った。上記(2)の可能性を考慮して、架橋剤を用い毒素と受容体の結合を補強した。使用した架橋剤 Sulfo-SBED (サーモフィッシャーサイエンティフィック) は、反応基としてサクシニルイミド基とフェニルアミド基を有し、架橋した後サンプルを還元条件下に置くことでビオチン標識を標的分子へ転移できる。毒素の合成ペプチドの N 末端から二番目のリジン残基にサクシニルイミド基を介して Sulfo-SBED を付加させておき、これを標的細胞の培養上清に加えて培養した。一定時間後、UV を照射してペプチドと受容体をフェニルアミド基を介して架

橋した。架橋した細胞を可溶化し、ストレプトアビジンを結合させた磁気ビーズでペプチド受容体複合体を分離した。分離したサンプルを還元条件下で SDS-PAGE により展開し、ウエスタンブロットによりストレプトアビジンまたは抗ビオチン抗体で検出されるタンパク質を確認した。一方、同条件で展開したアクリルアミドゲルを銀染色し、ウエスタンブロットで確認した受容体候補分子に相当するタンパク質バンドを切り出して MS 解析で分子を同定した。ペプチドと標的細胞との反応時間や温度、可溶化剤の種類、標識磁気ビーズとの反応条件を変えながら上記の操作を繰り返し、感受性の細胞を用いたときに特異的かつ再現性よく見られるタンパク質分子の同定を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 受容体への結合に必須な DNT の最小領域を検討するため、様々な長さの N 末端領域をヒト IgG の Fc セグメントに連結し、融合タンパク質として Cos7 細胞で発現させた。これら融合タンパク質を含む Cos7 細胞の培養上清を用いて、全長毒素の活性に対する阻害効果を検討した。毒素の活性は、感受性細胞における転写活性化因子 serum response factor の活性をルシフェラーゼを利用したレポーターアッセイで検出した。その結果、N 末端の 30 個以上のアミノ酸を融合したタンパク質を加えたときに阻害効果が認められ、それ以上 C 末端側を短くすると阻害効果がなくなることがわかった (図 1)。阻害効果の見られた N 末端配列のうち一番短い 30 アミノ

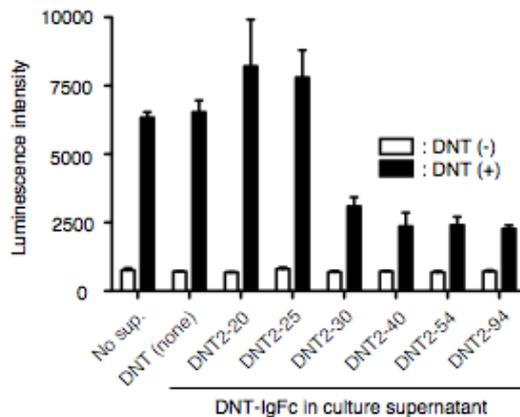


図1 融合タンパク質添加時の全長DNTの活性

酸をペプチドとして合成し、同様に阻害効果を検討したところ、このペプチドは濃度依存的に全長毒素の活性を阻害し、その阻害効果は全長 DNT の受容体への結合を競合的に阻害することで発揮されていることがわかった。以上のことから、DNT は少なくとも N 末端 30 アミノ酸の領域があれば感受性細胞に結合できることが明らかとなった。

(2) DNT の受容体を同定するため、(1) で明らかにした結合最小領域を用いてアフィニティー精製を行った。リガンドとして DNT の N 末端 30 アミノ酸をペプチド合成し、架橋剤 Sulfo-SBED で標識した。この標識 DNT を毒素感受性細胞である骨芽細胞株 MC3T3-E1 に様々な条件で反応させ、架橋された分子を MS 解析で同定した。いくつかの分子が検出されたが、機能的な受容体の同定には至らなかった。そこで、①架橋される分子のうち、受容体結合領域に特異的に結合する分子をより明確に判定するため、ネガティブコントロールとして感受性細胞への結合が認められない N 末端 25 アミノ酸をペプチド合成し、リガンドに追加した。②アフィニティー精製には、ストレプトアビジンビーズと架橋剤に付加されたビオチンとの相互作用を利用して、両者の結合が強力で目的分子を溶出することができず、ワンステップの精製しかできないため、特異的に結合した分子を MS 解析で同定できる状態まで精製することができなかった。そこで、His タグ付きのペプチドを新たに合成し、タグを利用した、溶出が可能なアフィニティー精製過程を追加することで、より特異性の高い結合分子の精製・濃縮を試みた。改善の結果、N 末端 30 アミノ酸と特異的に架橋されるいくつかの分子が再現よく検出された。これらを MS 解析により同定したところ、細胞質内に存在すると報告されているタンパク質であったため、目的の受容体ではないと考えられた。また、タンパク質量の問題で MS 解析できていない分子もあり、これらに関しては精製材料をスケールアップするなどのさらなる検討が必要であると考えている。

(3) アフィニティー精製の過程で、DNT が細胞外マトリクスに特異的に付着することを見いだした。Sulfo-SBED 標識 DNT と架橋される分子の中に細胞外マトリクスの主要な構成成分であるファイブロネクチンが含まれていた。骨芽細胞株 MC3T3-E1 における DNT の局在を免疫染色で調べたところ、細胞表面のファイブロネクチンネットワーク上に DNT が局在することが確認できた(図2)。

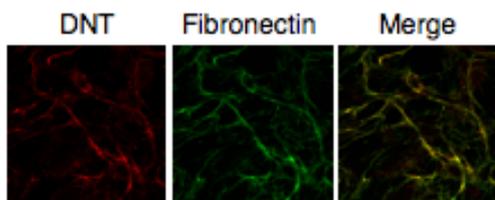


図2 DNTとファイブロネクチンの共局在

しかし、本毒素とファイブロネクチンとの直接的な結合は認められず、ファイブロネクチンネットワークを形成しているが DNT が付

着しない細胞も存在することから、DNT とファイブロネクチンとの間に別の分子が介在する可能性が示唆された。この仲介分子はネットワークに付着する細胞の培養上清中に含まれることがわかったため、上清からの精製を試みたところ、候補分子として N 末端側を欠損したニドジェン2を同定することができた。このタイプのニドジェン2は未報告であり、DNT との直接的な結合などの詳細については現在解析中である。

DNT のファイブロネクチンネットワークへの付着は、①pH 依存的であり、酸性条件でより親和性が高いこと、②環境中の毒素濃度の低下に伴って上清中に再び遊離することがわかった。この遊離した毒素は活性を有していたことから、DNT が細胞外マトリクスにその活性を維持したまま一時的に保持され、環境の pH や毒素濃度の変化に従ってそこから遊離し、周辺に存在する感受性細胞に効率よく作用している可能性が考えられた。DNT は、*Bordetella bronchiseptica* 感染症である“ブタ萎縮性鼻炎”で見られる鼻甲介骨萎縮(鼻曲がり)の原因因子として知られているが、その標的細胞である骨芽細胞は粘膜下織より深部に存在している。上記の成果より、感染局所において菌体で産生された DNT が、他の病原因子により障害された上皮組織を拡散していき、粘膜下織に豊富に存在する細胞外マトリクスへの親和性を利用して深部へ移行し、骨芽細胞に効果的に作用している可能性が考えられた。

## 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4件)

① 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

② Fukui-Miyazaki, A., Kamitani, S., Miyake, M., and Horiguchi, Y. (2010) Association of *Bordetella* dermonecrotic toxin with the extracellular matrix. *BMC Microbiol*, **10**: 247-255. 査読有

[その他]

ホームページ等

[http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp/2011Web/Horiguchis\\_Lab\\_top.html](http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp/2011Web/Horiguchis_Lab_top.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

福井 理 (Fukui Aya)

大阪大学微生物病研究所・分子細菌学分  
野・助教

研究者番号：70397743