

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07542

研究課題名(和文) ボルデテラ属細菌のIII型分泌装置の活性化に關するBcr4の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Bcr4 involved in activation of the Bordetella type III secretion system

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Bordetella bronchiseptica (気管支敗血症菌)は、グラム陰性病原菌に共通するIII型分泌システム(T3SS)を介してエフェクターと呼ばれる病原性タンパク質を宿主細胞内に注入することが知られている。我々は、これまでに気管支敗血症菌のT3SS活性を制御するBcr4と呼ばれるシャペロン様タンパク質を同定してきた。今回の研究で、Bcr4はT3SSのロッドタンパク質であるBscIの安定性に關わるシャペロンであることを明らかにした。インナーロッドタンパク質のシャペロンについては初めての報告であり、ロッドタンパク質の安定性を制御することで、T3SSの分泌が制御される新たな発見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グラム陰性病原菌の多くはIII型分泌装置と呼ばれる針状の構造を有しており、この装置を介してエフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞内に移行させる。III型分泌装置の制御を理解することで、細菌の病原性とその制御法についての情報を得ることが可能であり、新たな薬剤創生の基盤となる。本研究では、III型分泌装置の内部構造を形成するBscIと呼ばれるタンパク質の安定性は、シャペロンであるBcr4によって制御されることを新たに見出した。Bcr4は気管支敗血症菌や百日咳菌などのボルデテラ属細菌に特異的なタンパク質であり、シャペロンを介したIII型分泌装置の固有な制御を理解することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Bordetella bronchiseptica is known to inject pathogenic proteins called effectors into host cells via the type III secretion system (T3SS), which is common among Gram-negative pathogens. We have previously identified a chaperone-like protein called Bcr4 that regulates T3SS activity in *B. bronchiseptica*. In this study, we show that Bcr4 interacts with BscI, a rod protein of the T3SS. This is the first report of chaperone for an inner rod protein and a new finding that T3SS secretion is regulated by controlling rod protein stability.

研究分野：細菌学

キーワード：ボルデテラ属細菌 気管支敗血症菌 III型分泌装置 シャペロン ロッドタンパク質 Bcr4 BscI

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る。2010年に米国の西海岸で起きた百日咳の大流行では、乳幼児10人が死亡しており、ワクチン接種率が高い北米や我が国においても百日咳の制御は重要である。このような背景から、新たな薬剤標的ならびに新規ワクチン抗原の探索を視野に入れた病原性解析が重要となっている。百日咳菌はヒトに対して極め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*) を用いた *in vivo* での病原性解析がおこなわれている。

申請者らは、気管支敗血症菌のIII型分泌装置 (T3SS) とそれによって分泌される基質の機能を明らかにしてきた。T3SS は病原因子排出システムの一つで、エフェクターとよばれる病原因子を宿主細胞内に注入する。気管支敗血症菌のエフェクター移行に際して、BopB と BopD が会合することでトランロコン (宿主細胞膜に穴をあけてエフェクター移行を助ける) を形成することを報告してきた。さらに、BteA (BopC) は細胞傷害を誘導する一方で、BopN は IL-10 産生を誘導するエフェクターであることを明らかにしてきた。

菌体内で産生されたエフェクターはシャペロンと会合することで、菌体内での安定化と T3SS への効率的な輸送が行われる。ボルデテラ属細菌においてエフェクター固有のシャペロンは不明であるが、BopD のシャペロンとして BcrH2 を同定してきた (データ未発表)。興味深いことに、*bcrH2* 遺伝子の直下流にはシャペロン様の遺伝子 *bcr4* がコードされており、その下流には BLAST サーチからロッドタンパク質、内膜リング、機能未知タンパク質、スポークタンパク質 (分泌装置と ATPase を繋ぐ) をそれぞれコードする遺伝子 *bscI*, *bscJ*, *bscK*, *bscL* が位置している。そこで Bcr4 欠損株を作製しそのフェノタイプを精査したところ、T3SS による菌体外分泌が完全に阻害され、一方、Bcr4 過剰発現株では III 型分泌タンパク質の菌体外分泌の異常な亢進が認められた。これらのことから、Bcr4 は T3SS のコンポーネントに作用するシャペロンとして機能することを推測した。

2. 研究の目的

T3SS におけるシャペロンの役割は、エフェクター・トランロコンと相互作用し、それらタンパク質の菌体内での安定化を図るとともに、分泌装置プラットフォームに効率的に輸送することである。T3SS の構成因子、たとえば、菌体から突出したニードル構造、ニードル下部にあるロッド構造も T3SS を介してマシーナリーの然るべき位置に輸送されるが、最近の研究でニードル構成タンパク質にも特異的シャペロンが会合することが明らかになり、シャペロンの概念が広がりつつある。一般的に、シャペロンとその基質をコードする遺伝子は近傍に位置しており、*bcr4* 下流にはロッドタンパク質をはじめとして T3SS の構成因子と推定される *bscI*, *bscJ*, *bscK*, *bscL* が位置している。これらのことを踏まえると、Bcr4 は遺伝的近傍に位置する T3SS の構成因子のシャペロンとして機能して、構成因子の菌体内での安定化とフォールディング、輸送に関与していることが推察される。

T3SS が宿主細胞にエフェクターを移行させるためには、1) 分泌装置の構築、2) トランロコンの輸送、最後に、3) 細胞内へのエフェクター移行という、分泌される基質の秩序だった輸送が必要となる。近年、ロッド構造が基質における分泌のオーダーを制御していることがサルモネラで明らかとなり、Bcr4 がロッド構造あるいは内部コアのタンパク質との相互作用を通して基

質の秩序だった分泌に関わっている可能性がある。本研究で、Bcr4 と相互作用するタンパク質を明らかにすることで、T3SS がどのようなメカニズムで活性化（閉じた状態から分泌ゲートが開くこと）されるのか、新たな知見を提供できると考えられる。

3．研究の方法

シャペロンとその基質をコードする遺伝子は近傍に位置しており、*bcr4* 下流にはロッドタンパク質をはじめとしてT3SSの構成因子と推定される *bscI*, *bscJ*, *bscK*, *bscL* が位置している。これらのことを踏まえると、Bcr4 は遺伝的近傍に位置する T3SS の構成因子のシャペロンとして機能し、構成因子の菌体内での安定化とフォールディング、輸送に関与していることが推察される。そこで、Bcr4 と相互作用するタンパク質を同定するために、V5 エピトープタグで標識した *BscI*, *BscJ*, *BscK*, *BscL* を大腸菌にて発現させ、His タグを付加した Bcr4 を用いてプルダウン法にて解析した。

4．研究成果

プルダウンアッセイの結果、Bcr4 は T3SS のロッドタンパク質である *BscI* と相互作用することが明らかになった。Bcr4 の各種変異体を用いたプルダウンアッセイと Bcr4 各種変異体を生産する気管支敗血症菌の分泌タンパク質のプロファイルから、Bcr4 の C末端領域が *BscI* と相互作用することで、T3SS 活性を制御することが示された。さらに、*BscI* を欠損させると、気管支敗血症菌からのIII型分泌タンパク質の分泌、細胞傷害性エフェクターである BteA の哺乳類培養細胞への移行が消失することを明らかにした。また、*BscI* は Bcr4 の非存在下では不安定であることを示した。これらの結果より、Bcr4 は *BscI* を安定化させることで T3SS の構築をサポートしていることが示唆された。これまで、T3SS の針状構造、ポア形成因子には固有のシャペロンがそれらの安定性に関与することが示されていたが、インナーロッドタンパク質のシャペロンについては初めての報告であり、シャペロンを介して T3SS の分泌が制御される新たな発見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Goto Masataka, Hanawa Tomoko, Abe Akio, Kuwae Asaomi	4. 巻 202
2. 論文標題 Transcriptional Downregulation of a Type III Secretion System under Reducing Conditions in <i>Bordetella pertussis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00400-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00400-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Ichiro, Hosomi Koji, Nagatake Takahiro, Tobou Hirokazu, Yamamoto Daiki, Hayashi Ikuo, Kurashima Yosuke, Sato Shintaro, Shibata Naoko, Goto Yoshiyuki, Maruyama Fumito, Nakagawa Ichiro, Kuwae Asaomi, Abe Akio, Kunisawa Jun, Kiyono Hiroshi	4. 巻 32
2. 論文標題 Persistent colonization of non-lymphoid tissue-resident macrophages by <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 133-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kimishima Aoi, Hagimoto Daichi, Honsho Masako, Watanabe Yoshihiro, Iwatsuki Masato, Tsutsumi Hayama, Inahashi Yuki, Naher Kamrun, Sakai Kazunari, Kuwae Asaomi, Abe Akio, Asami Yukihiko	4. 巻 69
2. 論文標題 Insights into the structure activity relationship of a type III secretion system inhibitor, aurodox	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128779 ~ 128779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2022.128779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木下紗綾, 桑江朝臣, 阿部章夫
2. 発表標題 ボルデテラ属細菌が産生するタンパク質BopNの機能領域の解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤雅貴, 桑江朝臣, 阿部章夫
2. 発表標題 百日咳菌におけるIII型分泌タンパク質の産生条件の検討
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤雅貴, 桑江朝臣, 花輪智子, 阿部章夫
2. 発表標題 百日咳菌におけるIII型分泌タンパク質の産生条件の検討
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下紗綾, 桑江朝臣, 阿部章夫
2. 発表標題 ボルデテラ属細菌が産生するタンパク質エフェクターBopNの機能領域の解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下沙綾, 桑江朝臣, 阿部章夫
2. 発表標題 ボルデテラ属細菌が産生するタンパク質BopNの機能領域の解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤雅貴, 桑江朝臣, 阿部章夫
2. 発表標題 百日咳菌におけるIII型分泌タンパク質の産生条件の検討
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑江朝臣, 西村隆太郎, 阿部章夫
2. 発表標題 気管支敗血症菌のBcr4はIII型分泌機構に必須なタンパク質でありBspRの機能を制御す
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masataka Goto, Asami Kuwae, Akio Abe
2. 発表標題 Investigation of the mechanism by which Bcr4 controls T3SS activity in Bordetella Bronchiseptica
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mao Yamashita, Asami Kuwae, Akio Abe
2. 発表標題 Analysis of interaction between Bordetella BteA and human Moesin
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/akiobe 北里大学大学院感染制御科学府・細菌感染制御学研究室 https://sites.google.com/view/abe-lab/home
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------