

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07485

研究課題名(和文)細菌が産生するBteAファミリータンパク質の細胞死誘導機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of cell death induced by BteA family proteins

研究代表者

桑江 朝臣 (Kuwa, Asaomi)

北里大学・感染制御科学府・准教授

研究者番号：60337996

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)：本研究では百日咳菌をはじめとするボルデテラ属細菌が産生するBteAの機能解析、およびBteAの分泌に關与するIII型分泌装置の活性化メカニズムについて研究を行った。百日咳菌*B. pertussis*におけるIII型分泌装置の活性化メカニズムについては不明であった。我々は百日咳菌が環境中の酸化還元状態を感知してIII型分泌装置を活性化していることを見出した。またIII型分泌装置の基部構造に含まれるBsclというタンパク質が菌体内で安定に保持されるためにBcr4というタンパク質が必要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでボルデテラ属細菌のIII型分泌装置およびそこから分泌されるタンパク質に関しては動物を宿主とする気管支敗血症菌が主に研究対象とされ、百日咳菌では効率的にIII型分泌装置が活性化される条件が見出されていなかった。本研究では培地中から還元剤を除去すると百日咳菌のIII型分泌装置が活性化されるBteAなどのエフェクターが効率よく培地中に分泌されることを見出した。またIII型分泌装置の基部構造中のロッド様タンパク質が菌体内で安定に保持されるために必要なタンパク質に関しては、不明であったが、本研究でBcr4というタンパク質がロッド様タンパク質Bsclの安定性に必須であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the function of BteA secreted from type III secretion system in *Bordetella pertussis*. We also analyzed the activation mechanism of the *B. pertussis* type III secretion system. Our results suggest that *B. pertussis* sense the environmental oxidation/reduction situation and suppress the type III secretion system when the medium includes a reducing agent, e.g. ascorbic acid. The type III secretion system is composed of needle structure and basement that located in both inner and outer membrane of *Bordetella*. Our results suggest that *Bordetella* Bcr4 protein is necessary for the stability of Bscl, which is one of the component of the type III secretion system basement structure.

研究分野：医科細菌学

キーワード：百日咳 ボルデテラ III型分泌装置 エフェクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)百日咳菌をはじめとするボルデテラ属細菌は III 型分泌機構と呼ばれる病原因子分泌装置を有しており、その分泌装置から分泌される BteA というタンパク質は単独で哺乳類細胞に再感染を誘導することが明らかになっている。ボルデテラ属細菌のうち動物を感染宿主とする気管支敗血症菌の III 型分泌機構を活性化させる培養条件は明らかになっていたが、ヒトを宿主とする百日咳菌の III 型分泌機構が活性化させる条件は見出されていなかった。

(2)ボルデテラ属細菌は先に述べたように、III 型分泌装置から BteA をはじめするエフェクターと呼ばれるタンパク質群を菌体内から哺乳類細胞の細胞質に直接注入する。III 型分泌装置の活性に Bcr4 と呼ばれるタンパク質が必要であることを明らかにしてきたが、その機能については不明であった。

2. 研究の目的

(1)気管支敗血症菌を用いた BteA の機能解析についてはいくつか我々のグループからの報告を含め、研究が進んでいるが、百日咳菌の感染においても BteA が重要な役割を果たしているかどうかは、BteA を効率的に百日咳菌に産生させるような条件が不明なため研究が進んでいなかった。本研究では培養細胞等を用いた百日咳菌の感染実験を通して BteA の必要性を調べることを目的とした。

(2)ボルデテラ属細菌が産生する Bcr4 と呼ばれるタンパク質が III 型分泌装置の活性化にどのように関与しているか分子レベルで明らかにし、Bcr4 の感染過程における具体的な役割を解明するために研究を行った。

3. 研究の方法

(1)これまでに百日咳菌の培養に用いる培地として数種類の培地が報告されている。それらの培地を用いて、百日咳菌を培養した。また培養温度、培養時に振盪するか静置するかなど、培養条件についても検討を行った。

(2) Bcr4 と相互作用するタンパク質を同定するために Bcr4 をコードする遺伝子断片を大腸菌用の発現ベクターに挿入し、組換え型 Bcr4 を精製した。Bcr4 と相互作用する可能性が考えられた候補タンパク質の遺伝子も同様に発現用のベクターに挿入し、タンパク質の精製を行った。それらの候補タンパク質が Bcr4 と相互作用するかどうかをプルダウンアッセイ法などを用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1)百日咳菌は通常 SS 培地と呼ばれる液体培地で培養するが、この培地では BteA の産生は認められなかった。一方で LCA 培地という培地で百日咳菌を培養したところ BteA の効率的な産生が認められた(図 1)。これら 2 つの培地の成分を比較したところ LCA 培地では SS 培地と比較して、カザミノ酸とアスコルビン酸の量が少なかった。これらの成分のどちらが BteA の産生制御に関与しているか解析を行ったところアスコルビン酸の量を減少させると BteA の産生量が増大することが明らかとなった。アスコルビン酸は還元剤の一つであるため、培地中にアスコルビン酸以外の還元剤である DTE などを添加して培養したところ、アスコルビン酸と同様に BteA の産生量が低下した。これらの結果より、百日咳菌は環境中の酸化還元状態を感知して III 型分泌装置の活性化、分泌タンパク質の産生・分泌を制御していることが示唆された。

(2) Bcr4 をコードする遺伝子の周辺領域に存在する遺伝子から産生されるタンパク質と Bcr4 の相互作用試験を行ったところ BscI と呼ばれるタンパク質と Bcr4 が特異的に相互作用することが強

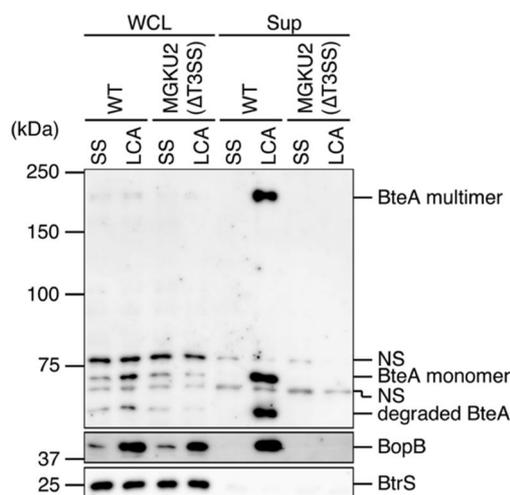


図1 百日咳菌をLCA培地で培養すると培養上清(Sup)にBteAのシグナルが検出される。

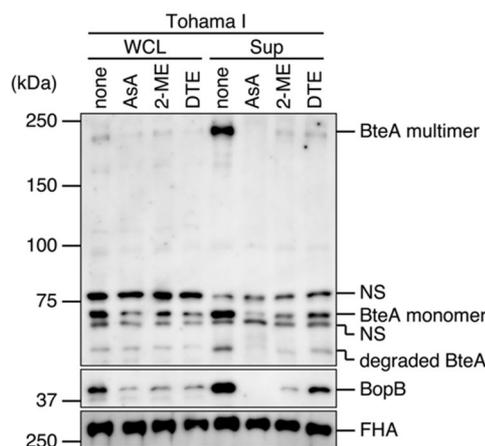


図2 培地にアスコルビン酸(AsA)、2-メルカプトエタノール、ジチオエリスリトール(DTE)等の還元剤を添加するとBteAのシグナルが消失する。

く示唆された(図3)．ボルデテラ属細菌の BscI の機能は不明であった．これまでに報告されている他の菌のタンパク質との比較により，BscI は III 型分泌装置の基部構造の中のロッドと呼ばれる部位を構成するタンパク質であることが予想された．BscI をコードする遺伝子を人工的に破壊し，BscI 欠損株を作製した．BscI 欠損株では予想通り III 型分泌装置の活性を喪失しており，BscI が III 型分泌機構に必須なタンパク質であることが明らかになった．BscI と Bcr4 がそれぞれい

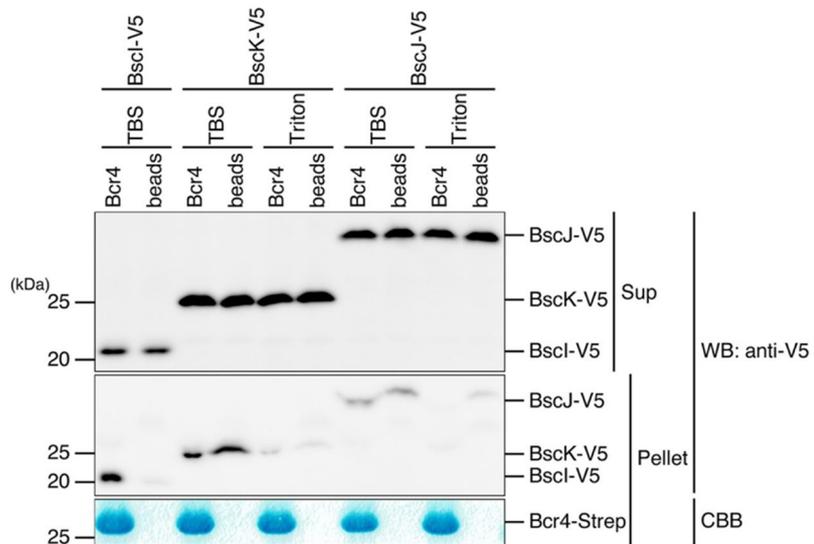


図3 Bcr4をプローブとしてプルダウンアッセイを行うと，沈降画分（一番左のレーン，真ん中のPelletのパネル）にBscIのシグナルが認められる．

ずれの領域で相互作用するのか解析を行った．精製タンパク質を用いた実験結果より，Bcr4 の N 末端半分の領域，あるいは Bcr4 の C 末端半分の領域は BscI との結合活性を喪失したことから，Bcr4 の大半の領域が BscI との相互作用に必要であることが示唆された．Bcr4 の遺伝子を人工的に破壊した Bcr4 欠損株の菌体内では BscI の検出が困難になる一方で，Bcr4 欠損株においてその他の III 型分泌装置構成タンパク質は菌体内で維持されていたことから Bcr4 は BscI と結合することによって BscI の安定性を維持するシャペロンと呼ばれるタンパク質であることが強く示唆された．これまでに III 型分泌装置から分泌されるタンパク質を菌体内で安定に維持するシャペロンタンパク質はいくつか同定されており，それらのシャペロンにはサイズが 13~18 kDa 前後，pI が低い等の共通した性質が認められている．Bcr4 はそれらの性質を備えていた．また AlphaFold2 によって Bcr4 の構造を予測したところこれまでに他の菌で同定されているシャペロンタンパク質と構造的な相同性が認められた（図4）．

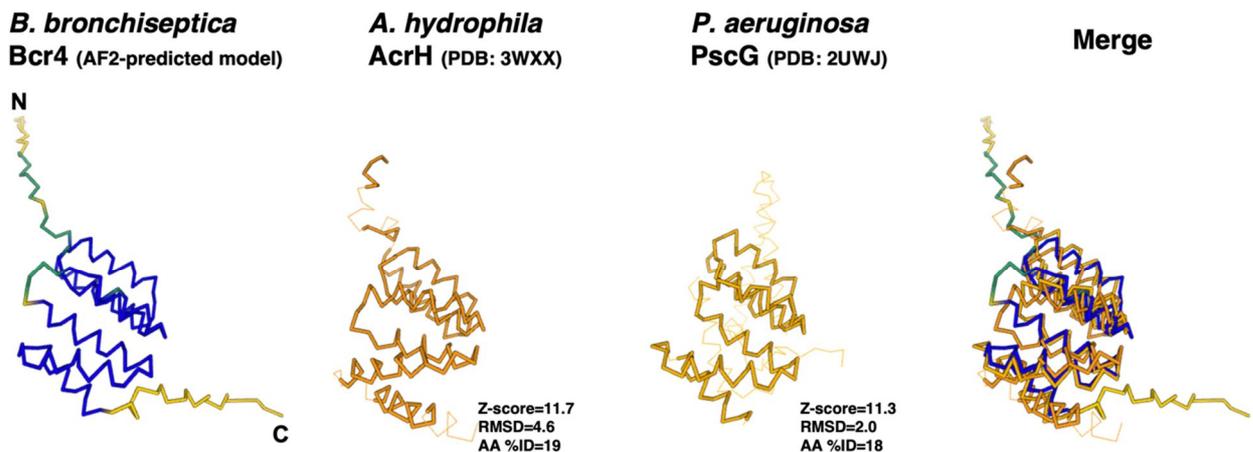


図4 AlphaFold2によるとBcr4は他の菌のシャペロンタンパク質 AcrH, PscGと構造的に相同性を有することが予測された．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4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 Masataka Goto, Akio Abe, Tomoko Hanawa, Asaomi Kuwae	4. 巻 -
2. 論文標題 Bcr4 is a Chaperone for the Inner Rod Protein in the Bordetella Type III Secretion System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.09.28.462275	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 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 Bordetella pertussis	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 Kikuchi Yuta, Matsui Hidehito, Asami Yukihiro, Kuwae Asaomi, Inahashi Yuki, Hanaki Hideaki, Abe Akio	4. 巻 75
2. 論文標題 Landscape of blaNDM genes in Enterobacteriaceae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 559 ~ 566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-022-00553-3	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 Kimishima Aoi, Hagimoto Daichi, Honsho Masako, Watanabe Yoshihiro, Iwatsuki Masato, Tsutsumi Hayama, Inahashi Yuki, Naher Kamrun, Sakai Kazunari, Kuwae Asaomi, Abe Akio, Asami Yukihiro	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 -

1. 著者名 桑江朝臣	4. 巻 54
2. 論文標題 BteAによる細胞死誘導機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 586 ~ 587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 桑江朝臣	4. 巻 6
2. 論文標題 BteAによる細胞死誘導機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1256 ~ 1258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山下真緒, 桑江朝臣, 阿部章夫
2. 発表標題 ボルデテラ属細菌のBteAとヒトMoesinの相互作用の解析
3. 学会等名 第104回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤雅貴, 桑江朝臣, 阿部章夫
2. 発表標題 気管支敗血症菌が産生するBcr4によるIII型分泌装置制御機構の解析
3. 学会等名 第104回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下真緒, 桑江朝臣, 阿部章夫
2. 発表標題 ボルデテラ属細菌のBteAとヒトMoesinの相互作用の解析
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 後藤雅貴, 桑江朝臣, 花輪智子, 阿部章夫
2. 発表標題 気管支敗血症菌が産生するBcr4によるIII型分泌装置制御機構の解析
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 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103回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2020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BopNの機能領域の解析
3. 学会等名 第103回日本細菌学会関東支部総会
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 小河俊伸、桑江朝臣、阿部章夫
2. 発表標題 Bordetella属細菌の産生するタンパク質BteAとBopNの相互作用領域の解析
3. 学会等名 第105回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸野裕也、桑江朝臣、阿部章夫、岡田信彦
2. 発表標題 Bordetella属細菌の産生するBcrH1の機能解析
3. 学会等名 第105回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平林亜希、桑江朝臣、阿部章夫、柴山恵吾、鈴木仁人
2. 発表標題 薬剤耐性グラム陰性細菌を標的とした抗菌アジュバントの探索と創製
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤雅貴、桑江朝臣、花輪智子、鈴木仁人、阿部章夫
2. 発表標題 ボルデテラが産生するBcr4はIII型分泌装置のロッドタンパク質のシャペロンである
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小河俊伸、桑江朝臣、阿部章夫
2. 発表標題 Bordetella属細菌の産生するタンパク質BteAとBopNの相互作用領域の解析
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------