

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月14日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390133

研究課題名（和文） ボルデテラ属細菌のエフェクターの網羅的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of *Bordetella* type III effectors

研究代表者

阿部 章夫（ABE AKIO）

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号：50184205

研究成果の概要（和文）：百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) に代表されるボルデテラ属細菌は、III型分泌装置 (type III secretion system; T3SS) を利用して、エフェクターと呼ばれる病原因子を宿主の細胞内に注入する。宿主に移行したエフェクターは、宿主側因子と相互作用することで病態発症に関与している。本研究では百日咳菌の類縁菌である気管支敗血症菌を用いて、新規エフェクターを同定し、BspR (*Bordetella* secreted protein regulator) と命名した。このエフェクターの機能解析を行ったところ、i) 宿主細胞の核内に移行後、宿主側因子であるhnRNP H と相互作用すること、ii) 菌体内ではT3SSやその他の病原因子をグローバルに調節する転写制御因子であること、を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Bordetella* species including *Bordetella pertussis* deliver effectors into host cells via a type III secretion system (T3SS). Effector-host factor interaction alters host physiological conditions, leading to disease process. In this study, we identified and analyzed new effector (designated BspR) in *Bordetella bronchiseptica*. BspR effector was translocated into the nucleus, and then interacted with hnRNP H. Interestingly, BspR was a global transcriptional regulator for T3SS and other virulence factors in bacterial cytosol.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（真菌学）

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

1. 研究開始当初の背景

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) によって惹起される呼吸器感染症であり、痙攣性の咳発作を発症する。WHO の報告によると

世界の患者数は年間5千万人、死亡者数は約30万人であり、そのほとんどが発展途上国の乳幼児である。しかしながら、ワクチン接種率が高い北米やEUにおいても、百日咳患者

数は増加の一途をたどっているのが近年のサーベイランスで明らかとなり、また、わが国においても成人百日咳の集団感染が報告されたのは記憶に新しい。このように従来のワクチンでは制御が困難な、いわゆるワクチンに馴化した百日咳菌の出現が報告されており、百日咳は再興感染症として重要視されつつある。

百日咳の発症機序は依然として不明な部分が多いが、T3SSが百日咳菌の気道への長期定着に関与していることが明らかにされた。グラム陰性病原菌の多くは、T3SSを保持しており、エフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞内に注入する。エフェクターと宿主側因子が相互作用することで、感染現象が惹起される。我々のグループでは百日咳菌の類縁菌である気管支敗血症菌 (*B. bronchiseptica*) を用いて、長期定着に関わる因子の解析を行ってきた。

2. 研究の目的

我々はこれまでの研究で、BopCとBopNエフェクターの機能を明らかにしてきた。T3SSによって宿主内に移行するエフェクターの機能については、サルモネラ、赤痢菌、腸管出血性大腸菌などで研究が展開している。いずれの細菌においても、数十のエフェクターが宿主細胞内に移行し、病原性に関与している。

一方、ボルデテラ属細菌においては、BopCとBopNが同定されているのみで、他のエフェクターの存在が推察されている。本研究の目的は、ボルデテラ属細菌におけるエフェクターに依存した感染機構の全体像を明らかにするために、機能未知なエフェクターについて網羅的同定・解析を行い、百日咳の感染制御の分子基盤を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 新規エフェクターの同定： T3SSに依存したエフェクターを同定するために、気管支敗血症菌の野生株とT3SS欠損株から分泌タンパク質を調製する。分泌タンパク質中にはT3SS以外の分泌タンパク質も含まれるが、野生株と欠損株との比較解析にて、T3SSに依存したエフェクターの同定が可能である。Hybrid LC/MS/MS Systemとisobaricペプチドによるラベル化システムにより、ボルデテラ属細菌が分泌するタンパク質についてプロテオーム解析を行い、本菌が産生する分泌タンパク質を同定した。

(2) エフェクターの評価： 上記方法で得られた新規エフェクター候補については、気管支敗血症菌の染色体DNAを鋳型として、PCRにて目的遺伝子を増幅し、*blaM* (β ラクタマーゼをコードする)の融合遺伝子を得る。融合遺伝子の発現ベクターを気管支敗血症菌

にエレクトロポレーション法にて導入する。エフェクター遺伝子が*BlaM*と融合された場合は、菌体の融合遺伝子産物はIII型分泌装置を介して菌体外に分泌される。すなわち菌体培養上清から分泌タンパク質を調製し、抗*Bla*抗体にてウエスタン法を行うことでエフェクターの一次スクリーニングを行った。一次スクリーニングを通過したエフェクター候補については、III型分泌装置欠損株を用いて同様な操作を行い、融合タンパク質がIII型分泌装置に依存して分泌されるのかについて確認した。

(3) エフェクターの宿主移行能の評価： エフェクター候補については、*blaM*との融合遺伝子の発現ベクターを導入したボルデテラ野生株を用いて感染実験を行った。エフェクターがT3SSを介して培養細胞のなかに移行するののかについては、CCF2/AM試薬を用いて解析した。この試薬は細胞内に入るとエラスターゼの作用で緑色の蛍光を発するが、細胞内に*blaM*産物である β ラクタマーゼが存在すると構造変換を生じて青い蛍光を発する。すなわちエフェクターと*BlaM*融合産物が細胞内に移行すると、感染細胞は青色の蛍光を発する。感染細胞が発する蛍光波長のシフトにて、エフェクター移行を評価した。

4. 研究成果

(1) 新規エフェクターの同定： 分泌タンパク質の質量分析・宿主細胞への移行能試験より、20 kDaの新規エフェクターを同定して、BspR (BB1639: *Bordetella* secreted protein regulator)と命名した。このエフェクターは、*btr*遺伝子座のなかにコードされており、III型分泌装置をコードする遺伝子クラスターの直近傍に位置していた。気管支敗血症菌のBspR欠損株を作製し、マウスでの感染実験を行ったところ、BspR欠損株では病原性が著しく低下したことから、BspRは病原性に関わる因子であることを明らかにした。

(2) 宿主細胞内での挙動： BspR-FLAGタグ融合タンパク質を細胞内で過剰産生後、抗FLAG抗体による免疫沈降を行い、質量分析にてBspRと相互作用する宿主側因子を解析したところ、hnRNP Hを同定した。蛍光顕微鏡を用いた局在解析により、BspRとhnRNP Hは核に共局在していた。宿主側因子hnRNP Hは、RNAのスプライシングを制御していることから、BspRがスプライシングに何らかの影響を及ぼすことが示唆された。

(3) 菌体内での挙動： 興味深いことにBspR欠損株ではIII型分泌タンパク質の産生量が亢進しており、相補株では野生株と同じような産生パターンを示した。さらにqRT-PCR解析の結果、BspRはIII型分泌タンパク質を転写レベルで調節していることを明らかにした。

T3SS, 線維状赤血球凝集素 (Fha), パータクチン等の病原因子は, 二成分制御系である BvgA-BvgSによって厳密な制御を受けていることが知られている。BspRはIII型分泌装置の発現を負に調節しているが, その一方で, FhaB やパータクチンの発現を正に調節していた。BspR欠損株と野生株より全菌体成分を調製して, 2 菌株間で顕著に変動する菌体内タンパク質を解析したところ, BspR欠損でBvgAの発現が顕著に増加した。他グループの報告より, BvgA発現量の違いによって, BvgA-BvgS支配下の遺伝子が正負に調節されることが明らかになっている。これらのことから, BspRはBvgAの発現量を調節することで多くの遺伝子をグローバルに制御することが強く示唆された。

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 13 件)

- 1) Jun Kurushima, Asaomi Kuwae, Akio Abe: The type III secreted protein BspR regulates the virulence genes in *Bordetella bronchiseptica*, PLoS ONE 7: e38925, 2012
DOI: 10.1371/journal.pone.0038925
- 2) Jun Kurushima, Asaomi Kuwae, Akio Abe: Btc22 chaperone is required for secretion and stability of the type III secreted protein Bsp22 in *Bordetella bronchiseptica*, FEMS Microbiology Letters, 331: 144-151, 2012
DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02561.x
- 3) Jun Kurushima, Asaomi Kuwae, Akio Abe: Iron starvation regulates the type III secretion system in *Bordetella bronchiseptica*, Microbiology and Immunology, 2012, 56: 356-362, 2012
DOI: 10.1111/j.1348-0421.2012.00442.x
- 4) Toshio Fukasawa, Akio Abe, Atsusi Nakamura, Miyako Horigome, Akira Naito: Solid-state NMR spectroscopy reveals anomer specific transport of galactose in the milk yeast *Kluyveromyces lactis*, FEMS Yeast Res. 2012, 12: 415-422, 2012
DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00788.x
- 5) 阿部章夫, 桑江朝臣: 病原細菌のエフェクターの分泌機構と病原性発揮の分子機構,

感染 炎症 免疫, 41: 2-11, 2011
<http://jglobal.jst.go.jp/public/2009042/2/201102263796229560>

6) Hyun-Ja Han, Asaomi Kuwae, Akio Abe, Yoshichika Arakawa, Kazunari Kamachi: Differential expression of type III effector BteA protein due to IS481 Insertion in *Bordetella pertussis*, PLoS ONE, 6: e17797, 2011
DOI: 10.1371/journal.pone.0017797

7) Kyota Kimura, Masato Iwatsuki, Takeshi Nagai, Atsuko Matsumoto, Yoko Takahashi, Kazuro Shiomi, Satoshi Omura and Akio Abe: A small-molecule inhibitor of the bacterial type III secretion system protects against in vivo infection with *Citrobacter rodentium*, The Journal of Antibiotics, 64: 197-203, 2011
DOI: 10.1038/ja.2010.155

8) Eiji Komatsu, Fuminori Yamaguchi, Akio Abe, Alison A. Weiss, and Mineo Watanabe: Synergic effect of genotype changes in pertussis toxin and pertactin on adaptation to an acellular pertussis vaccine in the murine intranasal challenge model, Clin Vaccine Immunol., 17: 807-12, 2010
DOI: 10.1128/CVI.00449-09

9) Jun Kurushima, Takeshi Nagai, Kanna Nagamatsu, Akio Abe: EspJ effector in enterohemorrhagic *E. coli* translocates into host mitochondria via an atypical mitochondrial targeting signal, Microbiology and Immunology, 54: 371-379, 2010
DOI: 10.1111/j.1348-0421.2010.00218.x

10) Kanna Nagamatsu, Asaomi Kuwae, Tadashi Konaka, Shigenori Nagai, Sei Yoshida, Masahiro Eguchi, Mineo Watanabe, Hitomi Mimuro, Shigeo Koyasu, and Akio Abe: *Bordetella* evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN, J. Exp. Med. 206: 3073-3088, 2009
DOI: 10.1084/jem.20090494

11) 阿部章夫: 感染現象 その理解の深化から疾患制御への展望: 細菌の病原因子分泌機構の新展開, 蛋白質 核酸 酵素 54 (8): 969-974, 2009

<http://search.jamas.or.jp/link/ui/2009214401>

12) 阿部章夫: 特集 感染症の現代的課題 [細菌のエフェクター輸送システムはどれだけわかっているのか], 生体の科学 60 (2) 別冊: 110-116, 2009

<http://www.bitway.ne.jp/ejournal/ocn/2425100833.html>

13) 阿部章夫: 病原細菌の分泌装置: その機能と病原性発揮のメカニズム, 感染症学雑誌 83 (2) 別冊: 94-100, 2009

<http://journal.kansensho.or.jp/Disp?pdf=0830020094.pdf>

[学会発表] (計 6 件)

1) Akio Abe, Functional analysis of a stealth effector, BopN, in *Bordetella*, IUMS 2011, 2011/9/8, Sapporo

2) 阿部章夫, ボルデテラ属細菌の自然免疫回避機構, 第 33 回 日本分子生物学会年会, 2010/12/9, 兵庫県神戸

3) Akio Abe, *Bordetella* immune evasion by type III effector, The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2010/9/8, 兵庫県淡路島

4) Akio Abe, Kanna Nagamatsu, Functional analysis of a stealth effector, BopN, in *Bordetella*, 第 83 回日本細菌学会総会, 2010/3/29, 横浜

5) Jun Kurushima, Akio Abe, Identification and characterization of a novel type III secreted effector in *Bordetella*, 第 83 回日本細菌学会総会, 2010/3/29, 横浜

6) Akio Abe, Kanna Nagamatsu, *Bordetella* evades the most host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopX, The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2009/9/10, 兵庫県淡路島

7) 阿部章夫, Bacterial secretion systems as potential targets for drug development, 日本放線菌学会学術講演会, 2009/10/9, 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ポリペプチド, ポリペプチドの生産方法および大腸粘膜組織の免疫制御組成物

発明者: 高橋一郎ら (10名)

権利者: 国立大学法人広島大学ら (4大学)

種類: 特許

番号: 2011-033867

出願年月日: 平成 23 年 2 月 18 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

研究室ホームページ:

http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/bact_infect/

研究室 Facebook:

<http://www.facebook.com/pages/北里大学細菌感染制御学研究室/103560459737868>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 章夫 (ABE AKIO)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号: 50184205

(2) 研究分担者

永松 環奈 (NAGAMATSU KANNA)

北里大学・北里生命科学研究所・助手

研究者番号: 90458745

(3) 連携研究者

()

研究者番号: