

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790484
 研究課題名（和文）ボルデテラ属細菌の産生するネクローシス誘導因子 BopC の作用機序の解析
 研究課題名（英文）Molecular mechanisms for necrosis induced by *Bordetella* BopC
 研究代表者
 桑江 朝臣 (KUWAE ASAOMI)
 北里大学・大学院感染制御科学府・講師
 研究者番号：60337996

研究成果の概要（和文）：百日咳菌を含むボルデテラ属細菌の病原因子であるタンパク質 BopC がどのように宿主細胞に細胞死を惹起するのかを解析した。ボルデテラ属細菌を感染させた哺乳類細胞の形態を経時的に観察した結果、BopC 依存的に哺乳類細胞は収縮した後に伸展し、細胞膜が破壊されることが明らかになった。また BopC 依存的なネクローシスはプロテインキナーゼ C の阻害剤などで特異的に抑制されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：I analyzed how BopC, which is the protein secreted from *Bordetella*, cause necrosis to mammalian cells. When mammalian cells were infected with *Bordetella*, the cells shrank and then spread before cell death. Moreover, protein kinase C inhibitor specifically suppressed cell death induced by BopC function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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，エフェクター，III 型分泌装置

1. 研究開始当初の背景

多くのグラム陰性病原菌は III 型分泌装置 (Type 3 secretion system; T3SS) と呼ばれる分泌装置をもっている。これらの細菌は T3SS を介してエフェクターと呼ばれるタンパク質群を菌体内から宿主細胞内へ直接注入することができる。注入されたタンパク質 (エフェクター) は宿主細胞側因子と相互作用し、シグナル伝達経路の活性化など宿主の生理機能を攪乱することにより、宿主を発症に至らしめる。百日咳菌 *Bordetella pertussis*、パラ百日咳菌 *B. parapertussis*、及び気管支敗血症菌 *B. bronchiseptica* の 3 種のボルデテラ属細菌の全ゲノム塩基配列が報告され (Parkhill et al, Nat. Genet. 35: 32-40)、そのいずれの染色体上にも T3SS を

コードする遺伝子群の存在が認められた。気管支敗血症菌に関して米国のグループから T3SS がラット気道への長期定着に重要な役割を果たすこと (Yuk et al, Mol. Microbiol. 28: 945-959, 1998)、T3SS から分泌されるエフェクターが宿主の免疫応答を抑制することが報告された。研究代表者は気管支敗血症菌の T3SS から分泌される BopB および BopD と呼ばれるタンパク質が複合体を形成し、宿主細胞膜上に形成されるポアの成分となることを見出し、このポアがエフェクターの注入に必須であることを報告した (Kuwae et al, Cell. Microbiol. 5: 973-983, 2003, Nogawa et al, J. Bacteriol. 186: 3806-3813, 2004)。また、ボルデテラの T3SS は宿主免疫応答を抑制することが米国のグループから報告さ

れ (Skinner et al, J. Immunol. 175: 4647-4652, 2005)、研究代表者等のグループでは T3SS から分泌される BopN が核内に移行し、NF- κ B p65 の核移行を阻害すること、および IL-10 の産生を促進して免疫応答を抑制することを報告した (Nagamatsu et al, J. Exp. Med. 206: 3073-3088, 2009)。一方で、研究代表者等と米国のグループが独立にほぼ同時期に気管支敗血症菌の最初のエフェクター BopC を同定し、BopC が細胞傷害活性を有すること (Fig. 2) を明らかにした (Kuwaie et al, J. Biol. Chem. 281: 6589-6600, 2006, Panina et al, Mol. Microbiol. 58: 267-279)。BopC の詳細な機能は未知であるが、研究代表者等の実験結果より、*B. bronchiseptica* がマウスを死に至らしめるために BopC が必須な因子であり、BopC が病原因子として重要な役割を果たしていることが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、ボルデテラ属細菌の病原性に必須であるが、機能の詳細が未知である BopC と呼ばれる分泌タンパク質が宿主細胞内に移行後、どのような分子と相互作用を行って病原性に貢献しているのかを解析する。BopC によっていかなる宿主応答が誘導されるかを明らかにし、ボルデテラ属細菌によって惹き起こされる百日咳を制御するにはいかなる宿主機能を阻害あるいは活性化することが必要であるか、その標的を本研究結果を基に探索し、百日咳に対するワクチンを含めた新規薬剤開発の分子基盤を確立することが本研究の目的である。

百日咳はワクチンによって予防可能な感染症であるが、今日においても、全世界で年間 30 万人にのぼる主に乳幼児の尊い生命が百日咳により奪われている。現在使用されている成分ワクチンの免疫持続期間は 10 年前後であり成分ワクチンの接種を受けたほとんどの成人は百日咳に対する免疫を有していない。さらに近年流行している百日咳菌はワクチンに耐性を示す場合が多い。このような背景から百日咳の罹患者数は増加の一途をたどっており、特に百日咳菌を保有する成人が、免疫をもたない乳幼児への感染源となることが問題となっている。百日咳菌は抗生剤に感受性であるが、百日咳の主症状である咳嗽発作を呈しているときには、感染者の気道に菌がほとんど検出されず、この時期に抗生剤を投与しても症状の緩和効果が認められない。

このような現状からワクチンの改良を含めた百日咳に対する新規薬剤の開発が強く求められている。百日咳菌の感染過程を分子レベルで解明し、本菌がどのような宿主側因子をコントロールしているか知ることが新規薬剤開発への道だと考えられる。

哺乳類培養細胞に BopC 全長を単独で発現させた場合、宿主細胞の膜に傷害が起こり、細胞内タンパク質であるラクトースデヒドロゲナーゼ (LDH) が培地中に放出される。研究代表者等の研究により、BopC の N 末端側半分と BopC の C 末端側半分の同時に培養細胞に発現させた場合も、LDH が培地中に放出されることがわかった。これは BopC の N 末端と C 末端が分子間あるいは分子内で相互作用していることを強く示唆している。本研究では、BopC が分子内・分子間で相互作用しているかどうかを明らかにする。BopC をコードする遺伝子上流には BtcA と呼ばれるタンパク質をコードする遺伝子が存在する。BtcA は菌体内タンパク質で BopC と相互作用し、BopC を菌体内で安定に保ち、効率的に分泌されることを補助するシャペロンであると予想されていた (Panina et al, Mol. Microbiol. 58: 267-279)。研究代表者等は BtcA が T3SS 依存的に分泌され、宿主細胞内で BopC と相互作用していることを示唆する結果を得た。また BtcA が BopC 依存的な細胞傷害性に補助的に働いていることも示唆された。これらのことから、本研究では、BtcA と BopC の特異的結合の有無と結合領域および BopC-BtcA 複合体の宿主細胞内での局在を明らかにする。さらに BopC と結合する宿主側因子を同定する。これらの解析を通して、BopC が標的としている宿主シグナル伝達系を解明する。

3. 研究の方法

BopC は T3SS を介して宿主細胞内に注入された後に、様々な分子と相互作用することによって細胞膜傷害を誘導すると考えられる。本研究では BopC 依存的な細胞傷害作用の詳細をあきらかにするために、BopC の分子内・分子間相互作用の有無、BopC と BtcA の宿主細胞内における相互作用の有無、BopC あるいは BtcA と相互作用する宿主細胞側因子の探索、を免疫沈降法、Strep-tactin を用いたプルダウン法、大腸菌を用いた two-hybrid 法を用いて解析し、さらに宿主細胞内でのそれぞれの分子間の相互作用を免疫蛍光染色法などを用いて調べる。

・ BopC の分子内・分子間相互作用の解析
BopC は 658 アミノ酸からなるタンパク質であるが、BopC の N 末半分 (1-312a. a. ;

N-moiety) と BopC の C 末半分 (313-658a. a. ; C-moiety) を哺乳類培養細胞内で発現させると、BopC 全長を発現させた場合とほぼ同様の細胞傷害活性を示す。本研究では、まず N-moiety と C-moiety をそれぞれ Halo タグと Strep タグを付与した組換え型タンパク質として、別々に大腸菌から精製した。精製した N-moiety と C-moiety を混合し、Halo タグ樹脂あるいは Strep-tactin 樹脂を用いた沈降実験により、共沈するか否かを調べた。

・BopC と BtcA の宿主細胞内における相互作用の解析

BopC の C-moiety と BtcA を COS-7 細胞に共発現させ、免疫蛍光染色を行なうとどちらのタンパク質も核周辺にパッチ状に染色されること、組換え型の BopC と組換え型の BtcA が結合することが報告されている (Panina et al, Mol. Microbiol. 58: 267-279) こと、BtcA の欠損株の細胞傷害活性は野生株より有意に低いこと、以上 3 つのことから BtcA が宿主細胞内で BopC と相互作用し、細胞傷害活性に補助的な役割を果たしていることが示唆された。

本研究では、まず FLAG タグを付与した BopC の C-moiety と BtcA を培養細胞内で共発現させ、細胞溶解液を調製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った場合に BtcA が共沈してくるかを調べた。また、BopC 全長と BtcA を培養細胞内で共発現させた場合に認められる細胞傷害性 (LDH の遊離量) と、BopC 全長のみを発現させた場合の細胞傷害性を比較して BtcA が BopC の補助因子となっているか調べた。

・BopC-BtcA 複合体の宿主細胞内の局在の解析

先に述べたように BopC の C-moiety と BtcA を HeLa 細胞に共発現させて免疫蛍光染色を行った場合、これら二つのタンパク質は共に核周辺に蛍光シグナルが認められることから、何らかの細胞小器官に局在している可能性が考えられた。そこで、BopC の C-moiety あるいは BtcA を発現させた HeLa 細胞を抗 EEA1 抗体 (初期エンドソーム)、抗カルレチキユリン抗体 (小胞体)、抗 Mannosidase II 抗体 (ゴルジ体)、抗 ERAB 抗体 (ミトコンドリア) 等のマーカー抗体と抗 BopC 抗体あるいは抗 BtcA 抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、いずれかの細胞小器官に局在しているかを調べた。

4. 研究成果

BopC の N 末端側半分と C 末端側半分は特異的に相互作用していることが強く示唆される結

果が本研究により得られた。今後はその特異性をさらに証明していくことと、その相互作用が病原性に重要であるかどうか調べていく予定である。他のグループからの報告により、BtcA は BopC を菌体内で安定させるシャペロンとしてはたらくことが示唆された。我々は BtcA が菌体内にとどまらずに、III 型分泌装置から分泌されることを見出し、BtcA が BopC のネクロシス誘導活性を補助する機能をもっているという仮説を立てた。BopC をコードする遺伝子を哺乳類細胞内発現用ベクターにクローニングし、そのプラスミドを HeLa 細胞などの培養細胞内に導入し、BopC の産生を誘導した。その結果、HeLa 細胞にネクロシスが誘導され、細胞膜破壊にともなってラクトースデヒドロゲナーゼの培地への遊離が認められた。もし BtcA が BopC のネクロシス活性を補助する作用をもっているなら、BopC と BtcA を同時に HeLa 細胞に産生させた場合、BopC を単独で産生させた場合よりも、培地中へ遊離するラクトースデヒドロゲナーゼの量が多くなると考えられる。BopC と BtcA を同時に HeLa 細胞に産生させたところ、ラクトースデヒドロゲナーゼの遊離量は BopC のみを産生させた場合と有意な差が認められなかった。この結果より、BtcA は BopC のネクロシス誘導活性を補助するのではなく、他の未知の機能をもっていることが示唆された。

BopC に依存した宿主応答の詳細を明らかにするために、気管支敗血症菌の野生株を感染させた上皮細胞の形態変化をタイムラプス撮影が可能な顕微鏡システムをもちいて解析した結果、BopC 依存的に哺乳類細胞は収縮した後に伸展し、細胞膜が破壊されることが明らかになった。

BopC 依存的な細胞膜破壊はプロテインキナーゼ C の阻害剤であるスタウロスポリン、またカルシウムイオンのキレーターである BAPTA-AM などにより特異的に阻害されたことから、BopC が直接的に宿主細胞膜に作用して膜破壊を誘導するのではなく、宿主細胞内のシグナル伝達経路を制御することによって細胞膜破壊を誘導していることが強く示唆された。これまでアポトーシスとよばれる細胞死に関しては、細胞内で活性化あるいは不活化されるシグナル伝達経路については多くの報告がなされてきたが、ネクロシスとよばれる細胞死と細胞内シグナル伝達経路の関連については未知な部分が多かった。近年ネクロプトーシスと名付けられた、細胞内シグナル伝達経路を介したネクロシス型の細胞死に関する報告がいくつかなされている。BopC が誘導する細胞死はネクロプト

ーシスの一つであると予想され、今後は BopC が誘導する細胞死のメカニズムを分子レベルで明らかにし、ネクロプトーシスに関与する新たなシグナル伝達経路の発見につながるように研究を展開する予定である。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 桑江朝臣, *Bordetella* immune evasion by type III effectors, 第 155 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 3 月 29 日, 東京大学駒場キャンパス
- ② 桑江朝臣, ボルデテラ感染における BopC の機能, 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18–20 日, 幕張メッセ
- ③ 桑江朝臣, *Bordetella* blocks phagocytosis and alters host cell signaling through BopC/BteA, a type III effector, The 34th Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine, 2012 年 10 月 17 日, シヤトレーゼガトーキングダム札幌
- ④ 桑江朝臣, *Bordetella* blocks phagocytosis and alters host cell signaling through BopC/BteA, a type III effector, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2012 年 9 月 13 日, ウェスティンホテル淡路島
- ⑤ 桑江朝臣, ボルデテラ属細菌の BopC は貪食運動を阻害する, 第 6 回細菌学・若手コロッセウム, 2012 年 8 月 8 日, 八王子セミナーハウス

[その他]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/life/chart/LSI-lab13.html>

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑江 朝臣 (KUWAE ASAOMI)

北里大学・大学院感染制御科学府・講師

研究者番号: 60337996