

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670215

研究課題名(和文) 菌体内と宿主核内で別機能をもつデュアルエフェクターBspR

研究課題名(英文) Dual effector BspR that functions in Bordetella and host cells

## 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳菌とその類縁菌である気管支敗血症菌は、BspRによって多くの遺伝子が制御されている。本研究にて、BspRはN末端領域の配列を介してIII型分泌装置依存的に宿主細胞内に移行後、さらに細胞の核内に移行することを明らかにした。本研究にてBspRは菌体内で転写調節因子として機能するだけでなく、細胞の核内でエフェクターとして機能することが強く示唆された。宿主内での機能を明らかにすることで、BspRのデュアルエフェクターとしての性質を提唱していきたい。

研究成果の概要(英文)：Many genes are regulated by transcriptional regulator, BspR, in *Bordetella pertussis* and its related strain, *B. bronchiseptica*. In this study, we demonstrated that BspR is translocated into the host cells via a type III secretion system (T3SS). Interestingly, BspR N-terminus is involved in the T3SS-mediated translocation and the nuclear transport. In this study, we revealed that BspR is not only a bacterial regulator, but also functions as a translocated effector into the host nucleus. Thus, we propose that BspR has an ability for a dual-effector that functions in bacteria and the host cells.

研究分野：医歯薬学

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

## 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り、再興感染症として猛威を振いつつある。これまで申請者らは、ボルデテラ属細菌のIII型分泌装置(T3SS)の詳細を明らかにしてきた。III型分泌装置は、多くのグラム陰性病原菌が保持する病原因子排出システムで、そのシリンジ様構造により、エフェクターとよばれる病原因子を宿主内に注入する。ボルデテラ属細菌のIII型分泌装置に依存した分泌タンパク質の網羅的解析から、エフェクターBopCとBopNを同定し、それらの機能を明らかにしてきた。BopCは細胞死を誘導すること、BopNはIL-10産生を誘導することで、宿主の炎症反応を回避するエフェクターであった。このようにBopCやBopNは、III型分泌装置によって感染細胞内に移行し宿主の生理機能を攪乱する(詳しいメカニズムは解っていない)ことで、感染状態の維持に関与している。一方、申請者らが新たに同定したBspRは、III型分泌装置によって菌体外に分泌されるものの菌体内ではグローバルな転写調節因子として機能している。これまでの研究で、BspRは 1) *in vivo*で病原性に関与する、2) III型分泌装置の発現を負に調節し、繊維状赤血球凝集素(Fha)やパータクチン(Prn)のような病原因子を正に調節する、3) 鉄濃度に応答し遺伝子発現のスイッチングをおこなう、ことを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

(1) 申請者らはボルデテラ属細菌のエフェクターの網羅的解析から、新規な転写調節因子を発見し、BspR (*Bordetella secreted protein Regulator*)と命名した。予備的な実験で、BspRは菌体内で転写調節因子として機能する一方で、III型分泌装置によって宿主細胞内に移行することが示唆された。本研究は、BspRの宿主細胞内への移行能力を精査するこ

とで、宿主内動態を詳しく解析するものである。

(2) 本研究が進展することで、菌体内と宿主細胞の両方で機能する病原因子の性質が明らかとなり、細菌の病原因子論に新たな展開をもたらすことが予想される。また、BspRは多様な遺伝子を制御していることが知られている。この性質を利用して、病原因子の新たな探索手法を確立し、ワクチンを含む感染制御の基盤を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) BspRの宿主移行の解析: BspRは菌体内で転写調節因子として機能する一方で、III型分泌装置によって菌体外に分泌される。BspRはBopCやBopNなどの他のエフェクターと同様に宿主細胞に移行するののかについて、2つの異なるレポーターアッセイ系で評価する。一つはアデニル酸シクラーゼ毒素(CyaA)を利用するレポーター系である。CyaAは哺乳類細胞内に存在するカルモジュリンによって特異的に活性化され、細胞内cAMP量を増加させる。BspR下流にこのCyaAを連結した融合タンパク質を作製する。BspR-CyaAがIII型分泌装置を介して細胞内に移行するとCyaA活性により細胞内のcAMPが上昇する。細胞内のcAMP量を測定することで、BspRの宿主移行能を定量的に評価するものである。また、もう一つは、TEM-1(-ラクタマーゼ)融合遺伝子とCCF2/AM基質を利用するアッセイ系を用いた。CCF2/AM試薬は細胞のエステラーゼによってCCF2に変換され緑色蛍光を発する。このとき細胞内にTEM-1が存在すると、CCF2の-ラクタム環が開裂し緑色の蛍光は青色へと変化する。細胞が発する蛍光波長の違いを蛍光顕微鏡で観察することで、BspR-TEM-1融合タンパク質の細胞内移行をライブセルで検出することが可能である。異なる性質のアッセイ系を

併用することで、BspRの細胞内移行の評価が可能である。

(2) 新規ワクチン抗原の探索: 現行ワクチンのコンポーネントであるFHAやパータクチンはBspRによって正の調節を受けている。これら遺伝子と同様に、BspRによって正の調節を受けている未知タンパク質に焦点を絞りワクチン抗原の探索を行う。具体的には気管支敗血菌の全菌体タンパク質の網羅的解析にてBspRに正の調節を受けている機能未知な膜タンパク質をワクチン候補とした。大腸菌の大量発現系にて、ワクチン抗原となるタンパク質を調製し、マウス(3.5週令)に10 µgを2回筋注投与する。次いで、百日咳菌(マウス肺内での定着は一過性であるが、ワクチン評価には本菌が使用される)を経鼻より感染させ、感染2, 5, 8日目のマウスより肺を摘出し、肺内菌数にてワクチン効果を評価する。効果の判定には、現在、市販されているワクチンを陽性対照として用いることで、客観的な判断を行う。

#### 4. 研究成果

(1) BspRの宿主移行の解析: BspR-CyaAならびにBspR-TEM-1を発現するベクターを気管支敗血症菌に導入したところ、細胞内移行を評価することはできなかった。BspRはIII型分泌装置の発現を負に制御していることを明らかにしているが、BspRをプラスミド上で発現させると、遺伝子量効果のためにIII型分泌装置の発現が極端に抑制された。そこで、腸管病原性大腸菌(EPEC)のIII型分泌装置を用いてBspRの宿主移行能を評価した。事実、EPECにおいてBspRを発現させても、EPECのIII型分泌装置の機能を抑制することはなかった。そこで、BspR-CyaAならびにBspR-TEM-1の発現ベクターをEPECに導入後、培養細胞に感染させBspRの動態を観察した。その結果、BspRは細胞内に移行する能力があること、さらにBspRの部分欠失体を用いた実験より、III型分泌装

置に依存した細胞内移行には、BspRのN末端領域が必要であることを明らかにした。BspRの細胞内動態をより詳細に解析するために、*bspR* 遺伝子を培養細胞用の発現ベクターに組み込み HeLa 細胞に導入した。その結果、BspR は N 末端側の配列を介し細胞核内に移行することを明らかにした。核移行性のタンパク質は塩基性アミノ酸であるリジンとアルギニン残基が連なった核移行シグナル(NLS)を有しているが、BspRは典型的なNLSを有していなかった。本研究にてBspRが宿主細胞の核内でエフェクターとして機能することが強く示唆された。BspRの宿主内での機能については解析が進行中であり、今後の研究の展開で、原核・真核細胞の両方で機能する新たな概念の病原因子として提唱していきたい。

(2) 新規ワクチン抗原の探索: BspR支配下にありコンピュータ解析から膜に局在している未知タンパク質5種について、大腸菌内で大量精製を行った。この精製タンパク質を用いて感染防御実験をおこなったところ、防御効果のあるタンパク質を同定することはできなかった。さらなる解析をおこない感染防御効果を示す膜タンパク質を同定する予定である。

#### 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)

[雑誌論文](計 1 件)

Keisuke Okada, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Akio Abe, Asaomi Kuwae, Yasuhiko Horiguchi, Hiroyuki Abe: Complete Genome Sequence of *Bordetella bronchiseptica* S798, an isolate from a pig with atrophic rhinitis, Genome Announcements (査読あり), 2: e00436-14, 2014, DOI: 10.1128/genomeA.00436-14

[学会発表](計 3 件)

阿部 章夫 , Bacterial infection strategy by type III secretion system effectors , 88 回日本細菌学会総会 , 2015 年 3 月 26 日 , 長良川国際会議場 ( 岐阜県岐阜市 )

Akio Abe , The type III secreted protein, BspR, functions as a global regulator in *Bordetella bronchiseptica* , 10th International Symposium on *Bordetella* , 2013 年 9 月 10 日 , Dublin (Ireland)

阿部 章夫 , Functional analysis of a stealth effector, BopN, in *Bordetella* , 2014 年 3 月 26 日 , タワーホール船堀 ( 東京都江戸川区船堀 )

〔図書〕(計 1 件)

阿部 章夫 , 羊土社 , もっとよくわかる ! 感染症 , 2014 年 , 276 ページ

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/bact\\_infect/welcome.html](http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/bact_infect/welcome.html)

## 6 . 研究組織

### (1) 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

### (2) 連携研究者

桑江 朝臣 ( KUWAE Asaomi )

北里大学・感染制御科学府・准教授

研究者番号 : 60337996

北所 健吾 ( KITADOKORO Kengo )

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号 : 60283587