

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82704

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860324

研究課題名(和文) ボルデテラ属細菌のエフェクターBopNによる IL-10産生誘導機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of IL-10 produced by Bordetella effector BopN.

研究代表者

千葉 紗由利 (Sayuri, Chiba)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・光触媒グループ抗菌・抗ウイルス研究グループ・研究員

研究者番号：90528150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳を引き起こす百日咳菌の病原因子の1つであるBopNは、宿主のIL-10産生を亢進させて免疫応答を抑制するが、IL-10産生が誘導される機構の詳細は未だ不明であるため、本研究ではその解析を目的とした。培養細胞を用いた解析より、BopNの核内移行にはBopNの61-120アミノ酸領域とimportin-beta1が結合する必要がある、この領域を欠失するとIL-10の転写、NF-kappaBの局在変化、ERKのリン酸化などを誘導できなかった。これよりBopNの宿主IL-10産生誘導にはBopNの核内移行が必須で、核内移行によって感染時に生体の免疫応答を抑制状態へ移行させると考えられた。

研究成果の概要(英文)：One of Bordetella effector BopN is translocated itself into the nucleus and suppresses a host immune response by enhanced production of IL-10. BopN also induces a nuclear translocation of NF- κ B p50, but inhibits of NF- κ B p65. However, the molecular details of BopN function are unknown. To investigate the mechanism of the BopN nuclear import, coprecipitation analysis was carried out. It was found that BopN associates with importin β 1, a nuclear import factor. Next, the nuclear import of BopN was analyzed using expression vectors producing full length or various truncated BopN. The nuclear import of BopN was detected in all derivatives except 81-100 a.a deletion in BopN, and translocated BopN into nucleus was colocalized with importin β 1. Moreover, the nuclear translocation of NF- κ B p65 was not inhibited in 61-120 a.a deletion in BopN. Taken together, BopN 81-100 a.a. is involved in the importin β 1-mediated nuclear transport and may affect the subsequent signal transductions.

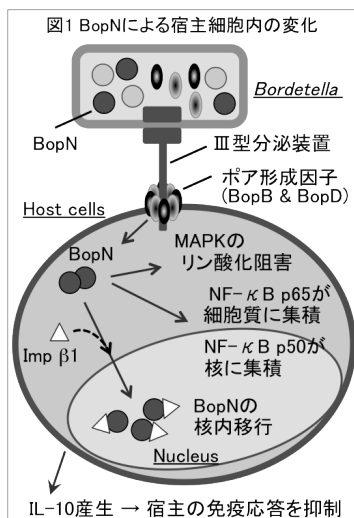
研究分野：感染免疫

キーワード：感染免疫 病原因子

1. 研究開始当初の背景

百日咳菌は主に乳幼児に劇症型の呼吸器感染症である百日咳を引き起こす起因菌で、WHOの報告によると現在でも全世界で年間30万人の乳幼児が死亡している。百日咳はワクチンの接種によって90-95%の発症が予防できるが、現行ワクチンの免疫持続期間は5-10年と短いため、ワクチン効果が減弱した成人の感染が急増し、乳幼児への感染源となるなど社会問題となっている。さらに近年では現行ワクチンに耐性を示す百日咳菌の流行が報告されており、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。

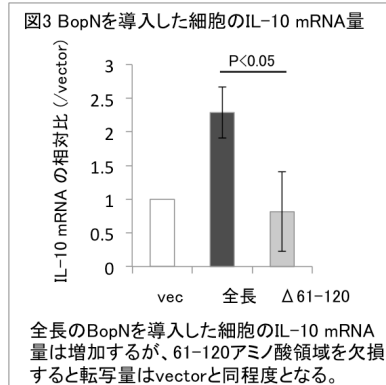
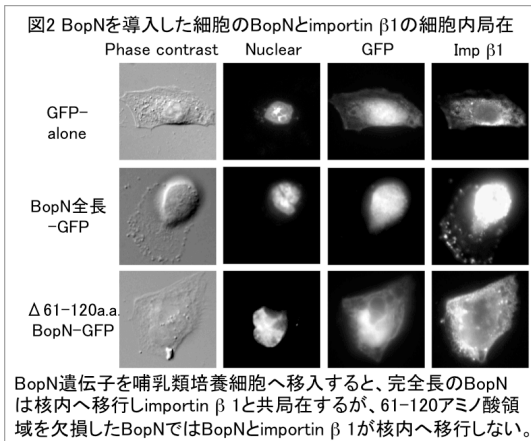
百日咳菌を含むボルデテラ属細菌は気道上皮へ付着した後、菌体外に突出したニードル様構造をもつⅢ型分泌装置を介して種々のエフェクターと呼ばれる分子を宿主細胞内へ注入して気道感染を成立させる(図1)。これまでにエフェクターであるBopCが宿主細胞に対する細胞傷害性を有することや、BopNは宿主のIL-10産生を亢進させて免疫応答を抑制することを明らかにされている。抗炎症性サイトカインであるIL-10は、多くの感染症において宿主の過剰な炎症反応を抑制して症状の劇症化を防ぐ。しかし、細菌感染時にIL-10産生が誘導される機構の詳細は未だ不明である。



2. 研究の目的

ボルデテラ属細菌のエフェクターの一つであるBopNが、宿主のIL-10産生を亢進させる。BopNは宿主細胞内のMAPKを阻害すると同時に核内へ移行してIL-10の産生を誘導し、宿主の免疫応答を抑制していると推察される。しかしながら、感染時のIL-10産生に関与するシグナル伝達経路や核内因子についての詳細な報告はまだない。

宿主細胞内へ打ち込まれたBopNは自身が核内へ移行すると同時にMAPKのリン酸化を阻害し、さらにNF-κB p50の核内移行とNF-κB p65の細胞質への集積を誘導するなど、細胞内のシグナル伝達を変化させることでIL-10産生を亢進させる(図1)。また、BopNは60-120アミノ酸領域で核内輸送因子のimportin β1と結合すること(図2)と、さらに60-120アミノ酸領域を欠失したBopNは宿主のIL-10産生を亢進できないこと(図3)が見出された。この結果よりBopNによるIL-10産生の誘導にはBopN自身の核内移行が重要であることが推察された。



本研究では、BopN が相互作用する宿主側因子を同定しての核内移行のメカニズムを解析し、BopN が影響を与えるシグナル伝達経路を明らかにすることで、BopN による宿主の IL-10 産生誘導のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、百日咳菌が宿主側因子をどのようにコントロールして百日咳という病態を形成するかという感染過程を分子レベルで明らかにすることで、百日咳のワクチンの改良を含めた新規薬剤の開発のための感染制御の分子基盤を確立することを目的とした。

具体的には、百日咳菌が宿主側因子をどのようにコントロールして IL-10 産生を誘導しているかを明らかにするため、以下の計画 1 および 2 の解析を *in vitro* において行った。さらに、*in vivo* においても *in vitro* で解明した機序と同様の機序で IL-10 産生が行われているかを明らかにするために、

- (1) BopN が核内移行する分子機序
- (2) BopN が関与するシグナル伝達経路
- (3) マウスを用いた解析

の 3 テーマを設け、BopN が宿主細胞の IL-10 産生を誘導する機構の解析を進めた。

なお本研究では百日咳菌のモデル菌株として、マウスに感染可能な気管支敗血症菌を使用した。

4. 研究成果

(1) BopN が核内移行する分子機序

BopN が宿主の IL-10 産生を誘導するには自身の核内移行が必須と考えられることから、BopN が相互作用する分子の同定と、核内への移行機序の解析を行った。

X 線結晶構造解析は時間を要するため、まずは BopN の部分欠失体を用いた解析を行った。

BopN には特定のモチーフが存在せず、アミノ酸配列から結合領域を推定できないことから、BopN と importin β 1 の結合領域の特定を BopN の部分欠失体による解析から試みた。各領域を欠失した BopN を HeLa 細胞に発現させた。それらの細胞内の各 BopN 部分欠失変異体および importin β 1 の局在を免疫蛍光染色にて解析すると同時に、各部分欠失 BopN を発現した細胞内の IL-10 の転写を RT-PCR 法にて測定した。この解析から、BopN が IL-10 産生を誘導するには自身の 61-120 アミノ酸領域で importin β 1 と結合して核内侵入を果たすことが必須であり、この領域を欠失すると IL-10 の転写を促進できなかった。

Importin β 1 との結合に重要な 61-120 アミノ酸領域を 61-80、81-100、101-120 アミノ酸領域に分け解析したところ、81-100 アミノ酸領域を欠失すると BopN と Importin β 1 の核内移行が起こらなかったが、101-120 アミノ酸領域を欠失すると BopN は核内移行下が Importin β 1 の核内移行が起こらなかった。これより、BopN の核内移行には Importin β 1 以外の核内移行分子が関与している可能性が推察された。

(2) BopN が関与するシグナル伝達経路

BopN は MAPK シグナル伝達系に制御に関与するとされている。そこで、核内移行の分子機序の解析より特定した核内移行ができないアミノ酸部分欠失 BopN を用いて、細胞内 MAPK 系のリン酸化阻害および NF- κ B の局在の変化を確認し、BopN の核内移行が細胞内の変化に与える影響と IL-10 産生を探った。

アミノ酸部分欠失 BopN を発現させた HEK293T 細胞の当該 MAPK あるいはその上流や下流のシグナル伝達分子のリン酸化や NF- κ B の局在をウェスタンブロット法にて検出するとともに、IL-10 産生量への影響を RT-PCR 法および ELISA 法にて評価した。

その結果、61-120 アミノ酸領域を欠失した BopN は、BopN による宿主細胞内の NF- κ B

p50 と NF- κ B p65 の局在変化を誘導できなかった。61-120 アミノ酸領域 BopN は BopN による ERK のリン酸化も誘導できなかったが、p38 のリン酸化には影響を与えることはなかった。

(3) マウスを用いた解析

前述の *in vitro* で解明した機序と同様の機序で *in vivo* の IL-10 産生が行われているかを明らかにするために、マウス由来の肺細胞および感染マウス用いた解析を行った。

気管支敗血症菌に感染したマウスの肺を解析したところ、野生株および他病原因子の欠失株では肺気管支上皮細胞上に菌体が存在していたが、BopN 欠失株に感染したマウスではその存在が一切確認されなかった。また、BopN 欠失株に感染したマウスの肺には著しい好酸球の浸潤が生じており、血清中から IL-5 および IgE も検出された。これより BopN の宿主 IL-10 産生を誘導するには BopN の核内移行が必須であり、核内移行によって感染時に生体の免疫応答を強く抑制状態へ移行させるものと考えられた。

(4) 結果と意義

当該研究分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義として、他のⅢ型分泌エフェクターの核内移行の解析にも寄与する可能性が挙げられる。

多くの細菌が核内へ移行する性質を持ったⅢ型分泌エフェクターを利用して病原性を発揮しているが、これらの核内移行メカニズムは明らかになっていなかったが、本研究より他のⅢ型分泌エフェクターの核内移行の解析にも importin を用いた核内移行の研究に寄与する可能性が期待される。また、BopN と遺伝的また機能的に類似しているエルシニア属細菌の YopN といった他のエフェクターとの機能的な相違点を見出すことで、ボルデテラ属細菌のエフェクターが宿主に病原性を示す機序を詳細に解明することも可能となる。

本結果を元にボルデテラ属細菌で高度に保存されている BopN が IL-10 を介して宿主の免疫応答を制御機構の解明がさらに進むことで、感染症学や免疫学の分野にも大きな影響を与えることが予想される。また百日咳の分子基盤を確立することで薬剤開発へのさらなる貢献が期待できると考える。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 紗由利 (Sayuri Chiba)

神奈川科学技術アカデミー 研究員

研究者番号：90528150