

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460535

研究課題名(和文) ボルデテラ属細菌のBopCによるアクチン依存的ネクローシス誘導機構の解析

研究課題名(英文) Analyses of the functions of Bordetella BopC that induce actin-dependent necrotic cell death.

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳はワクチンで予防可能な疾病として知られているが、近年ではワクチンの効果がない例が認められている。また百日咳の主症状である咳の発作もどのようなメカニズムで引き起こされるのが明らかになっていない。本研究ではワクチンを含めた抗百日咳薬を開発するための分子基盤を確立するために、百日咳菌が産生する病原因子のひとつであるBopCと呼ばれるタンパク質の機能解析を行った。その結果、BopCは哺乳類細胞の細胞骨格を司るアクチンと呼ばれるタンパク質の重合依存的に哺乳類細胞に細胞死を誘導することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Whooping cough is largely known as a vaccine preventable disease. However, there are many examples that children who were vaccinated have typical symptoms of whooping cough, meaning Bordetella pertussis, which is a causative agent of whooping cough, is obtaining resistance against the vaccine. It is also largely unknown the molecular mechanisms how B. pertussis cause the severe coughing. In the present study, we investigated the function of BopC, which is one of the virulence factors produced by Bordetella, during the bacterial infection. Our results suggest that BopC induce cell death against mammalian cells in the actin polymerization-dependent manner.

研究分野：医科細菌学

キーワード：百日咳 III型分泌機構 エフェクター

1. 研究開始当初の背景

(1) 百日咳菌を含むボルデテラ属細菌は宿主の気道に感染する菌であるが病原性大腸菌 O157 やサルモネラと同様に病原因子分泌装置である III 型分泌装置を有している。III 型分泌装置より分泌される因子はエフェクターと呼ばれ病原性に重要な役割を果たすことが知られている。ボルデテラ属細菌のエフェクターとして BteA が同定されているが、その機能については十分な解析がなされていない。

(2) 百日咳はワクチンにより予防可能な病気の一つと捉えられているが、近年は成人患者の増加が認められるとともに、ワクチン耐性の百日咳菌の流行が示唆されている。

2. 研究の目的

百日咳は激しい咳発作が主な症状として挙げられるが、既存の咳止め薬は効果がなく、また咳発作を呈している時に抗生剤を投与しても、菌は死滅するが咳発作を止めることは不可能である。百日咳菌による咳発作がいずれの病原因子によって引き起こされるかも不明である。さらに近年の報告では市中に流行している百日咳菌臨床分離株がワクチン標準化部と比較して、エフェクターである BteA の産生量が有意に高いことが示されている。このことは BteA がワクチン耐性に関与していることを示唆している。以上のことから、百日咳菌がどのようにヒトの気道に定着し、咳発作を惹起させているのかを分子レベルで明らかにし、新規の抗百日咳開発あるいはワクチン耐性機構解明のための分子基盤の構築を目的とし、本研究では特にエフェクターである BteA に注目して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 百日咳菌の類縁菌である気管支敗血症菌を感染させたラット肺上皮由来細胞 L2 の形態変化の経時的観察

これまでに BteA 依存的にボルデテラ属細菌が L2 などの哺乳類培養細胞の細胞死を誘導することが明らかになっており、また基底に付着していた細胞は BteA 依存的に核の凝縮、細胞質の収縮、基底からの剥離が誘導されることも明らかになっていた。感染過程において哺乳類細胞にどのような形態変化が誘導されるのかをより詳細に解析するために細胞培養用チャンバーと CCD カメラを備えた共焦点レーザー顕微鏡のシステムを用いた。

(2) 細胞膜の破壊を伴う細胞死の解析

BteA は膜破壊を伴う細胞死を哺乳類細胞に誘導することが明らかにされている。本研究において細胞死が誘導されたか否かを解析するために、哺乳類細胞の細胞外培養液中に遊離した乳酸脱水素酵素の量を測定するキットを使用した。

(3) 組換えタンパク質の精製

BteA の分子内の相互作用の解析を行うために、ヒスチジンタグあるいは Halo タグを付与した部分欠失型 BteA を大腸菌内で産生させ、精製した。

(4) 貪食細胞に取り込まれた菌数の測定

ボルデテラ属細菌の様々な菌株が樹状細胞などの貪食細胞に貪食される量を測定するために、ゲンタマイシンプロテクション試験を行なった。さらに感染させた貪食細胞を固定し、菌とアクチンを蛍光染色後、蛍光顕微鏡で撮影した写真をデコンボリューションソフトを用いて解析し、細胞内に取り込まれた菌の割合を算出した。

4. 研究成果

(1) ボルデテラ属細菌は BteA 依存的に哺乳類細胞に葉状突起の形成を誘導する。

気管支敗血症菌の野生株を L2 細胞に感染させたところ感染 1 時間後に細胞質が収縮し、その後、葉状突起の形成を伴う細胞伸展が誘導され、細胞膜が破壊されることが明らかになった。一方で BteA を欠損する変異株を感染させた場合にはそのような形態変化は認められなかった。本研究結果より、BteA 依存的に哺乳類細胞に葉状突起の形成が誘導されることが明らかになった。

(2) BteA 依存的な哺乳類細胞の細胞死はアクチン重合依存的である。

L2 細胞をアクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D により処理し、その後、気管支敗血症菌を感染させたところ、L2 細胞に細胞死や形態変化の誘導が有意に阻害された (図 1)。このことから BteA 依存的な細胞死や形態変化のはアクチン重合依存的に誘導されることが強く示唆された。これまでにアクチン重合依存的に細胞死が誘導されるという報告はほとんど存在せず、細胞死に関わる新たなシグナル伝達経路の存在が示唆された。

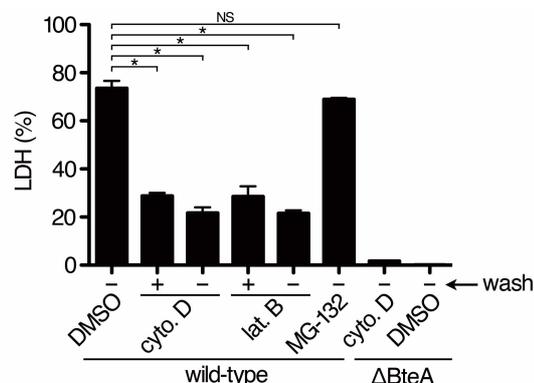


図 1. サイトカラシン D による細胞死の阻害

(3) BteA の N 末端側 200 アミノ酸領域は細胞死の誘導に必須ではない。

BteA のいずれの領域が哺乳類細胞に対する細胞死の誘導に必要であるのか解析する

ために、様々な部分欠失変異体を哺乳類細胞内で産生させ、細胞死が誘導されるかを調べた。その結果、N末端側の200アミノ酸を欠失したBteAも哺乳類細胞に細胞死を誘導することが明らかになった。

(4) BteAのN末端領域とC末端領域は異なる機能をコードしている。

BteAのN末端側領域(1 - 312 aa)とC末端側領域(313 - 658 aa)をそれぞれコードするDNAを哺乳類細胞内で産生させるためのプラスミドを作製した。それぞれのプラスミドを単独で哺乳類細胞に導入しても細胞死は誘導されなかった。一方でそれらのプラスミドを混合し、哺乳類細胞内でN末端領域とC末端領域を別々のオリゴペプチドとして産生させたところ、BteA全長を産生させた場合と同様に哺乳類細胞に細胞死を誘導することが明らかになった。

(5) BteAのN末端側とC末端側は相互作用する。

大腸菌より精製したBteAのN末端側の領域とC末端側の領域を試験管内で混合した後、プルダウンアッセイを行ったところ、N末端側はC末端側とともに沈降したことから相互作用していることが示唆された。またC末端側同士もプルダウンされたことから相互作用していることが示唆された。

(6) BteAは貪食細胞の貪食運動を阻害する。

BteAが感染においてどのような役割を果たしているのか手がかりをつかむために、マクロファージや樹状細胞などの貪食細胞に菌を感染させ、BteAが貪食運動に関与しているかを調べた。気管支敗血症菌の野生株をマウスマクロファージ細胞株J774A.1やマウス樹状細胞株DC2.4に感染させた場合の細胞内に取り込まれる菌数は、BteA欠損株を感染させた場合と比較して、有意に低かった。このことからBteAが貪食運動を阻害していることが示唆された。

(7) 今後の展望

我々はこれまでに百日咳菌の流行株が、ワクチン生産に用いられている標準株と比較してBteAの産生量が有意に高いことを示している。このことは、近年問題となっている百日咳菌のワクチン耐性とBteAが関与していることを示唆している。BteAの感染における機能や役割をより詳細に解析することにより、ワクチン耐性機構解明の手がかりをつかめる可能性がある。

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6件)

① 桑江朝臣, 阿部章夫, 2016年7月15日発行, 百日咳菌の細菌学的特徴と病原性因子, 臨床検査(医学書院) 第60巻 第7号 736 - 741, 査読なし

DOI: 10.11477/mf.1542200875

② J. Engman, A. Negrea, S Sigurlásdóttir, M Geörg, J Eriksson, O. S. Eriksson, A. Kuwae, H Sjölinger, and A.-B. Jonsson. *Neisseria meningitidis* polynucleotide phosphorylase affects aggregation, adhesion and virulence. *Infect Immun* 84(5): 1501 - 1512, (2016) Apr 22, 査読あり

DOI: 10.1128/IAI.01463-15

③ A. Kuwae*, F. Momose, K. Nagamatsu, Y. Suyama, and A. Abe. BteA Secreted from the *Bordetella bronchiseptica* Type III Secretion System Induces Necrosis through an Actin Cytoskeleton Signaling Pathway and Inhibits Phagocytosis by Macrophages. *PLoS ONE* 11(2): e0148387 *corresponding author (2016) Feb 1, 査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0148387

④ Y. Liu, D. Zhang, Å. Engstöm, G. Merényi, M. Hagner, H. Yang, A. Kuwae, Y. Wan, M. Sjölinger, and H. Sjölinger. Dynamic niche-specific adaptations in *Neisseria meningitidis* during infection. *Microbes Infect* 18(2): 109-117 (2016) Feb, 査読あり

DOI: 10.1016/j.micinf.2015.09.025

⑤ A. Abe, R. Nishimura, N. Tanaka, J. Kurushima, and A. Kuwae. The *Bordetella* Secreted Regulator BspR Is Translocated into the Nucleus of Host Cells via Its N-Terminal Moiety: Evaluation of Bacterial Effector Translocation by the *Escherichia coli* Type III Secretion System. *PLoS ONE* 10(8): e0135140 (2015) Aug 6, 査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0135140

⑥ K. Okada, Y. Ogura, T. Hayashi, A. Abe, A. Kuwae, Y. Horiguchi, and H. Abe.

Complete Genome Sequence of *Bordetella bronchiseptica* S798, an Isolate from a Pig with Atrophic Rhinitis. *Genome Announc* 2(3) (2014) e00436-14 May15, 査読なし

DOI: 10.1128/genomeA.00436-14.

[学会発表] (計5件)

① 2017年3月19~21日, 桑江朝臣, 西村隆太郎, 阿部章夫, ボルデテラ属細菌のIII型エフェクターBopNの分泌シグナルの解析, 第90回日本細菌学会総会 「仙台国際センター(宮城県仙台市)」

②2016年4月5日～8日, Asaomi Kuwae,
Fumitaka Momose, Kanna Nagamatsu, Yasuharu
Suyama, Akio Abe, BTEA SECRETED FROM THE
BORDETELLA INDUCES NECROSIS THROUGH AN
ACTIN CYTOSKELETON SIGNALING PATHWAY AND
INHIBITS PHAGOCYTOSIS BY MACROPHAGES, 11th
International *Bordetella* Symposium
「Buenos Aires (Argentina)」

③2016年3月23～25日, 桑江朝臣, 阿部章夫,
ボルデテラ属細菌のIII型エフェクターBopC
によるネクロシス誘導とマクロファージの
食食運動阻害, 第89回日本細菌学会総会「大
阪国際交流センター(大阪府大阪市)」

④2016年2月6日, 招待講演, ボルデテラ属細
菌の病原因子制御機構とIII型エフェクター
の機能, 桑江朝臣, 第50回緑膿菌感染症研究
会 シンポジウム6: 病原因子と病態の接点を
求めて「ヒルトン東京お台場(東京都港区)」

⑤2015年3月25～28日, 桑江朝臣, 阿部章夫,
Antiphagocytic effect of the type III
effector BopC secreted from *Bordetella*,
第88回日本細菌学会総会「長良川国際会議場
(岐阜県岐阜市)」

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/
bact_infect/publications.html](http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/bact_infect/publications.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・准教授
研究者番号: 60337996

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

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

(4) 研究協力者

百瀬 文隆 (MOMOSE, Fumitaka)

北里大学・大学院感染制御科学府・講師