

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460537

研究課題名(和文) 緊縮応答による百日咳菌の病原性発現調節機構

研究課題名(英文) Regulation of the pathogenicity by stringent response in *Bordetella pertussis*

研究代表者

花輪 智子 (HANAWA, TOMOKO)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：80255405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細菌が栄養飢餓に曝されると細胞内で(p)ppGppが蓄積し遺伝子発現が変化する。本研究では(p)ppGppの百日咳菌病原性発現における役割を明らかにするためグルタミン酸(Glu)飢餓を中心にその影響を解析した。

Glu枯渇時に百日咳菌体内の(p)ppGppは蓄積し、3型分泌機構(TTSS)遺伝子のmRNA量は有意に増加するがこれはBtrSによる転写の段階で調節されると考えられた。また、マクロファージへの付着率は(p)ppGpp欠損およびGlu飢餓により変化しなかったが、生残性には顕著に違いがみられた。以上の結果から(p)ppGppはマクロファージとの相互作用に重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In bacterial cells, nutritional starvation causes accumulation of (p)ppGpp which regulate various gene expressions. In the present study, we assessed the effect of (p)ppGpp and glutamate limitation to investigate its role in the regulation of pathogenesis. When glutamate was depleted, *Bordetella pertussis* accumulated (p)ppGpp and elevated mRNA of type 3 secretion system genes. On the other hand, the mRNA level of btrS which encodes transcription of TTSS genes were not altered. Therefore, (p)ppGpp probably affect the transcription by BtrS. Glutamate limitation increased survival rate within macrophages and lack of (p)ppGpp decreased it. Attachment to macrophages or epithelial cells were not affected by these conditions. Accordingly, it is suggested that (p)ppGpp have some role in the interaction to macrophages in *B. pertussis*.

研究分野：細菌の分子生物学

キーワード：百日咳菌 緊縮応答 遺伝子発現 3型分泌装置 栄養枯渇 グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

ワクチン普及により百日咳の患者数は激減した。しかしながらワクチン接種率が維持されているにもかかわらず、近年成人患者の割合が増加し、再興感染症となっている。従って、新たなワクチンの開発に向け、百日咳菌の感染、定着機構を明らかにすることが急務となっている。

百日咳菌の病原遺伝子の転写は BvgAS 二成分制御系により正に制御されており、活性化されると全ての病原因子が発現される (Bvg⁺-mode)。一方、これが不活性型であると病原性を示さない (Bvg⁻-mode)。宿主に感染すると BvgAS は活性型となるが、この活性化因子については未だ不明である。

これまで当研究室では BvgAS 活性型の下、RNA polymerase のサブユニットである E を介した細胞表面ストレスにより分泌された病原因子が安定化することを明らかにした。このことから宿主内で細菌の置かれた微少環境で BvgAS に加えて別の系により病原性の発現が制御されることが予想される。そこで本研究では栄養飢餓応答である緊縮応答により本菌の病原性が制御される可能性を検討した。

2. 研究の目的

細菌を取り巻く環境は変化に富んでおり、環境中において栄養源の枯渇に曝される機会も多い。緊縮応答は低栄養を感知すると細菌内で (p)ppGpp の蓄積が起こり、分裂速度を低下する等、種々の生理機能に変化が生じ、生残を可能にする応答である。(p)ppGpp により主として転写が制御されることで多種の遺伝子発現が変化するが、中には病原性に関与する遺伝子もこれに含まれていることが明らかとなっている。従って、緊縮応答は病原細菌の感染の際にも重要であると考えられている。

研究代表者らは先行研究により緊縮応答欠損株 (ppGpp⁰ 株) を用いて線毛のピリン蛋白量および型分泌装置 (TTSS) の発現が顕著に低下することを報告した¹⁾。本研究ではこれらの遺伝子の発現における (p)ppGpp の役割について検討し、緊縮応答による病原性調節機構について明らかにすることを目的とした。そのため、(p)ppGpp を定量し、緊縮応答を亢進させる培養条件を検索した。また、宿主内における緊縮応答の役割を解析するため、上皮細胞およびマクロファージに感染させてその定着および生残への影響を検討した。

3. 研究の方法

百日咳菌はグルコースをエネルギーとして利用する代謝系酵素遺伝子に欠損があり、培養には炭素源としてグルタミン酸を豊富に含む培地が用いられている。また、アミノ酸源としてカザミノ酸が添加することで増殖が良好となる。このグルタミン酸添加量を

低下させるか、もしくはカザミノ酸非添加により栄養飢餓環境にすることができる。その結果、グルタミン酸枯渇およびカザミノ酸非添加により TTSS 量が増加することを明らかにした。この応答は、解析した臨床分離株 5 株に加えてワクチン株であり、これまで TTSS の発現量が少ないことが明らかとなっていた Tohama 株にも同様にみられた。そこで種々の培養条件下、培養液中のタンパク質を TCA 沈殿により濃縮し、TTSS 因子のうち最も豊富に培地中に分泌される Bsp22 量を指標にして SDS-PAEG または Immunoblotting により TTSS タンパク質発現の解析を行った。

細胞内 (p)ppGpp の定量は、越智らの方法^{2, 3)}を参考に行った。各種培養液に終濃度が 1M となるよう氷冷したギ酸を加え、凍結融解を繰り返すことでヌクレオチドを抽出し、さらにその抽出液を凍結乾燥により濃縮してから Partisil 10 SAX (250 mm × 4.5 mm) 陰イオン交換カラムを用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離し、254 nm の吸光度により検出した。

プロテーム解析は野生株を通常培地およびグルタミン酸添加量を通常の 20% にした培地を用いて培養し、集菌、PBS で 3 回洗浄後、Lysis Buffer (40 mM Tris-HCl pH-8.0, 7M Urea, 3% CHAPS) に懸濁し、Protease inhibitor を加えて菌体をビーズ破砕 (15 秒、3 回) し、遠心後上清を回収して細胞質画分を調整した。これらのサンプルを界面活性剤除去カラム処理した後、タンパク質を画別に異なる蛍光試薬で標識し、MS 解析を行った。結果は通常培地で培養した細菌中タンパク質量を基準にして相対量として 2 倍以上の差があるものを陽性として判定した。

百日咳菌病原遺伝子の mRNA 量は百日咳菌の各種菌体中 RNA を Bacterial Reagent (QIAGEN 社製) により安定化した後、total RNA を抽出し、cDNA に逆転写した後、特的プライマーを用いて SYBER Green 法で real-time PCR により定量した。内部標準は *recA* 遺伝子発現量を基に $\Delta\Delta Ct$ 法で解析し、比較した。

細胞への付着影響には百日咳菌を A549 ヒト肺上皮細胞に添加し、1 時間の吸着後、PBS で 3 回洗浄した後に細胞を溶解させて生菌数をコロニー法で測定した。付着率は添加した菌を 100% として算出した。マクロファージ内生菌数は J774.1 細胞株に百日咳菌を吸着、貪食させ、PBS で細胞を洗浄した後に 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゲンタミシンを添加した 2% ウシ胎児血清を含む維持培地で培養し、継時的に PBS で洗浄した後に生菌数を測定した。

4. 研究成果

(1) 緊縮応答による TTSS 誘発の検討解析

各種培養条件下で培養した上清中タンパク質を SDS-PAGE で解析した結果、アミノ酸供給源であるカザミノ酸を含まない培地および鉄の欠乏によっても同様に TTSS の誘発

が生じることが明らかとなった。

次に、グルタミン含有量を 100% (通常培地) および 20% の培地枯渇条件における ppGpp 産生量の測定を行ったところ、TTP, CTP, ATP, GTP に続き ppGpp および pppGpp に由来するピークが現れた。そのピーク面積を用いて定量し、その変化量を算出した結果、20% グルタミン酸添加培地で培養した野生株は 26 時間後の (p)ppGpp 産生量は通常培地で培養した場合と比較して約 10 倍増加した (図 1)。また、カザミの酸添加の有無で比較した結果も同様に約 10 倍増加した。

これらの結果からカザミの酸、グルタミン酸の枯渇により緊縮応答が生じることが明らかとなった。今回行った方法により百日咳菌細胞内に蓄積する (p)ppGpp を測定することが可能であることが明らかとなった。

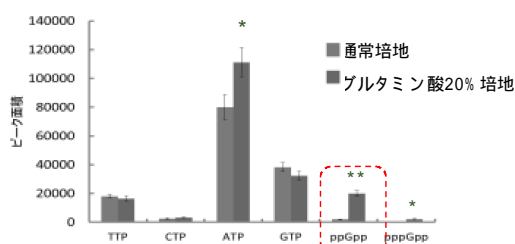


図 1. 各種ヌクレオチドのピーク面積の比較値は3回の測定結果の平均で示している。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Glutamate 100% に対する T test)

しかしながら数回の使用でカラムが詰まるなど、今後サンプル中不純物の除去などの課題が残っている。

また、グルタミン酸枯渇環境下のタンパク質発現を検討する目的でプロテーム解析を試みたが、発現量に顕著な変化がみられたタンパク質中にストレスタンパク質およびグルタミン酸取り込みおよび利用タンパク質が含まれていたものの病原因子は検出されなかった。これは標的となるタンパク質濃度が低いためであると考えられる。今後病原因子のプロセッシングや分泌に関わるペリプラスム、外膜画分を調整し、プロテオーム解析を行うことが必要であり、今後検討することとした。

(2) (p)ppGpp の TTSS 遺伝子発現調節機構

TTSS 遺伝子群は TTSS 装置および分泌される effector タンパク質をコードする遺伝子を含む領域と RNA polymerase の因子をコードする *btrS* 等を含む転写制御領域から成る。また、BtrS は TTSS の全ての遺伝子転写に必須であることが明らかとなっている。上記の結果より (p)ppGpp が細胞内に蓄積した結果、TTSS 発現の亢進が引き起こされることが示唆された。さらに (p)ppGpp がこれらの転写のどの段階に作用するかを明らかにする目的で、百日咳菌を通常培地とグルタミン酸減量培地で培養し、*btrS* および TTSS 構成要素および effector の遺伝子である *bsp22*, *bopN*, *bscN* の mRNA 量を qRT-PCR により測定

した。

その結果、TTSS 構成要素および effector の遺伝子の発現は分泌タンパク質と同様に有意な増加が見られたが、*btrS* 遺伝子の転写量には違いはみられず (図 2)。(p)ppGpp が BtrS による転写の段階で影響することが示

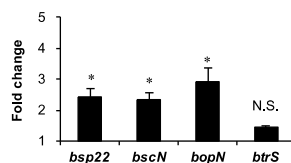


図 2. グルタミン酸枯渇による TTSS 転写物量への影響
** $p < 0.01$, N.S.: 有意差なし (通常培地で培養した場合に対する T test)

唆された。

(3) マクロファージ内および上皮細胞への影響

(p)ppGpp 欠損変異株の上皮細胞への付着は野生株と比較して有意に亢進した。一方で、マクロファージへの付着率に (p)ppGpp の欠損は影響しなかった。百日咳菌はマクロファージエスケープ機構を有していないことから食後経時的に生残菌数は低下する。しかしながら (p)ppGpp 欠損株では野生株より急激に生残菌数が低下した (図 3)。一方、グルタミン酸枯渇した細菌ではその減少速度は減少した。これらの結果から緊縮応答によりマクロファージ内生残能に重要であるものと考えられた。

今回、(p)ppGpp 定量系の確立にかなりの時間を割いた結果、当初計画していた DksA, Clp などその他の制御因子の検討を行うことができなかった。

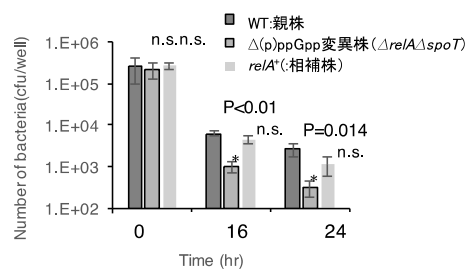


図 3 (p)ppGpp 欠損によるマクロファージ内生残菌数への影響

References

- 1) Sugisaki, K. et al., Microbiology. 2013; 159: 1379-89.
- 2) Hanawa, T. et al., J Bacteriol. 2015; 198: 343-51.
- 3) Ochi, K. et al., J Biol Chem. 1981; 256: 6866-75.
- 4) Takahashi, K. et al., PNAS. 2004; 101: 4320-4.

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3件)

Hanawa T, Kamachi K, Yonezawa H, Fukutomi T, Kawakami H, Kamiya S. Glutamate Limitation, BvgAS activation, and (p)ppGpp regulate the expression of the *Bordetella pertussis* type 3 secretion system. 98:343-51. 2016 doi:10.1128/JB.00596-15. (査読有)

Oguri S, Hanawa T, Matsuo J, Ishida K, Yamazaki T, Nakamura S, Okubo T, Fukumoto T, Akizawa K, Shimizu C, Kamiya S, Yamaguchi H. Protozoal ciliate promotes bacterial autoinducer-2 accumulation in mixed culture with *Escherichia coli*. J Gen Appl Microbiol. 61:203-10. 2015 doi: 10.2323/jgam.61.203. (査読有)

Zaman C, Osaki T, Hanawa T, Yonezawa H, Kurata S, Kamiya S. Analysis of the microbial ecology between *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota of Mongolian gerbils. J Med Microbiol. 63:129-37. 2014 doi: 10.1099/jmm.0.061135-0. (査読有)

〔学会発表〕(計12件)

T Hanawa, K Kamachi, H Kawakami, S Kamiya: Pellicle formation at the air-liquid interface by *Bordetella pertussis* April 5th-8th, 2016 Buenos Aires, Argentina 13th *Bordetella* symposium

花輪智子, 蒲地一成, 米澤英雄, 蔵田訓, 北条史, 大崎敬子, Zaman Cynthia, 神谷茂: 百日咳菌ペリクル型バイオフィルム内の病原因子に関する解析. 第89回日本細菌学会総会, 大阪, 2016年3月23-26日.

Hanawa T, Kamachi K, Yonezawa H, Kawakami H, Kamiya S: Characterization of pellicle formed by *Bordetella pertussis*. 7th ASM Conference on Biofilms, USA, October 24- 29 2015.

花輪智子, 蒲地一成, 米澤英雄, 大崎敬子, 神谷茂: 百日咳菌のバイオフィルム形成における3型分泌装置の役割. 第29回日本バイオフィルム学会学術集会, 蒲郡, 2015年7月10-11日

花輪智子, 米澤英雄, 蒲地一成, 大崎敬子, 蔵田訓, 北条史, シンシアザマン, 神谷茂: 百日咳菌3型分泌装置はバイオフィルム形成を促進する. 第88回日本細菌学会総会, 岐阜, 2015年3月25-28日

〔図書〕(計1件)

Hanawa T: Biofilm Formation and Environmental Signals in *Bordetella In:*

Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria. (Ed. Frans J. de Bruijn.). Ch. 22-4, Wiley, Hoboken NJ. 2016. p1279-1286.

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花輪 智子 (HANAWA, Tomoko)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号: 80255405

(2) 研究分担者

神谷 茂 (KAMIYA, Shigeru)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 10177587

(3) 連携研究者

山本 友子 (YAMAMOTO, Tomoko)

千葉大学・薬学研究科・教授

研究者番号: 60110342

(4) 研究協力者

Sandra K. Armstrong

ミネソタ大学・医学研究科・教授